C.N.R.S. A.O.3783.

UNIVERSITE DE NANCY FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le titre de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

KONG KIN-TCHEN

Ingénieur Civil des Eaux et Forêts

LIMITATION DE LA CELLULOLYSE DANS LES SOLS ORGANIQUES

Soutenue le 19 Octobre 1970
devant la Commission d'examen

JURY

MM. Ph. DUCHAUFOUR ..... Président
F. MANGENOT .....
Y. DOMMERGUES ..... Examinateurs.

UNIVERSITE DE NANCY FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée

à la Faculté des Sciences de l'Université de Nancy

pour obtenir le titre de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

KONG KIN-TCHEN

Ingénieur Civil des Eaux et Forêts

LIMITATION DE LA CELLULOLYSE DANS LES SOLS ORGANIQUES

Soutenue le 19 Octobre 1970
devant la Commission d'examen

JURY

MM. Ph. DUCHAUFOUR ..... Président
F. MANGENOT .....
Y. DOMMERGUES ..... Examinateurs.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents,

A mes Frères,

A mes soeurs

En témoignage de mon affection.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551919_0026

A mes Parents,

A mes Frères,

A mes soeurs

En témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur DUCHAUFOUR, Directeur du Centre de Pédologie Biologique du C.N.R.S. de Nancy, qui a accepté de diriger mes travaux de recherche, et qui m'a permis de profiter de l'éminent enseignement dispensé à son cours de Pédologie, j'adresse ici mes sentiments respectueux et reconnaissants.

A Monsieur le Professeur POCHON, Directeur du Service de Microbiologie du sol à l'Institut Pasteur, qui m'a aidé par ses conseils à améliorer mes connaissances dans le domaine de la microbiologie du sol, je dis ma profonde reconnaissance.

A Monsieur DOMMERGUES, Directeur de Recherche au Centre de Pédologie de Nancy, qui m'a accueilli dans son laboratoire et a dirigé toutes les étapes de mes travaux avec une inlassable patience et une grande sympathie pour m'éviter toute perte de temps, j'exprime mon affectueuse et respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur MANGENOT, qui a accepté de faire partie du jury de ma thèse, mes remerciements sincères,

Ainsi qu'à Madame CHARPENTIER, de la Faculté de Pharmacie de Paris, qui m'a prodigué ses conseils sur la dégradation de la cellulose en mettant à ma disposition les résultats de ses travaux les plus récents.

A Monsieur le Professeur BERNIER, de l'Université Laval, qui m'a encouragé et orienté pendant mon séjour au Canada, et dont le cours de Biochimie m'a apporté une aide précieuse pour mes travaux de recherche dans le domaine des enzymes, je donne ici le témoignage de mon respectueux attachement.

Je tiens aussi à remercier Monsieur BALANDREAU, qui m'a aidé à corriger le texte de mon mémoire avec beaucoup de patience et d'indulgence,

Madame FAIRISE, qui m'a aidé à résoudre mes nombreux problèmes personnels,

Et enfin, tous mes camarades du Centre de Pédologie de Nancy, qui sont venus si gentiment et si généreusement à mon secours matériellement et moralement, durant tout mon séjour à Nancy.

UNIVERSITE DE NANCY FACULTE DES SCIENCES

ANNEE SCOLAIRE 1969/1970

DOYEN : M. AUBRY

ASSESSEUR : M. GAY

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT - ROUBAULT

Professeurs honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY - LAPORTE - EICHBORN - CAPELLE - GODEMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ - DIEUDONNE - LONG-CHAMBON - LETORT - DODE - GAUTHIER - GOUDET - OLMER - CORNUBERT - CHAPELLE - GUERIN - WAHL

Maîtres de Conférences honoraires : MM. LIEHNART - PIERRET - Melle MATHIEU

PROFESSEURS

MM.

	ROUBAULT	Géologie
	VEILLET	Biologie animale
	BARRIOL	Chimie Théorique
	BIZETTE	Physique
	GUILLIEN	Electronique
	LEGRAS	Mécanique Rationnelle
	BOLFA	Minéralogie
	NICLAUSE	Chimie
	FAIVRE	Physique appliquée
	AUBRY	Chimie Minérale
	COPPENS	Radiogéologie
	DUVAL	Chimie
	TRULHING	Physique
	HILLY	Géologie
	LE GOFF	Génie chimique
	SUHNER	Physique expérimentale
	CHAPON	Chimie biologique
	HEROLD	Chimie minérale Indust.
	SCHWARTZ B.	Exploitation minière
	MALAPRADE	Chimie
*	MANGENOT	Botanique
	GAYET	Physiologie
	HADNI	Physique
*	BASTICK	Chimie
	DUCHAUFOUR	Pédologie
	GARNIER	Agronomie
	NEEL	Chimie Organique Ind.
	BERNARD	Géologie Appliquée
*	CHAMPIER	Physique
*	GAY	Chimie Biologique
	STEPHAN	Zoologie
*	CONDE	Zoologie
*	WERNER	Botanique
	EYMARD	Calcul différentiel et intégral
	FELDEN	Physique
*	GOSSE	Mécanique physique
*	DAVOINE	Physique (ENSMIM)
	HORN	Physique (I° cycle)
*	ROCCI	Géologie
*	Mme LUMER	Maths
	DESPUECH	Chimie Physique
	Melle HUET	Analyse Supérieure
	BLAZY	Minéralogie appliquée

N.....	Chimie Biologique
N.....	Mécanique Appliquée
N.....	Méthodes Mathématiques de la Physique
N.....	Mécanique Rationnelle

(*) Professeur titulaire à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme	BASTICK	Chimie P.C. Epinal	BALESDENT	Thermodynamique, Chimie appliquée (ENSIC)
MM.	GODEFIN	Physique		
	VUILLAUME	Psychophysiologie	JANOT	Physique P.C. Epinal
	FRENTZ	Biologie animale	CACHAN	Entomologie appl. (ENSA)
	MARI	Chimie (ISIN)	JACQUIN	Pédologie & Chimie agri.
	DEVIOT	Physique du solide	MAINARD	Physique M.P.
	FLECHON	Physique du P.C.	PAULMIER	Mécanique Expérimentale
	VIGNES	Metallurgie	PROTAS	Minéralogie
	JURAIN	Géologie C.B.G.	RIVAIL	Chimie appliquée (CUCES)
	MARTIN	Chimie P.C.	DEPAIX	Probabilités et statistiques

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	VILLERMAUX	Génie Chimique	GERL	Physique (ENSEM)
	METCHE	Biochimie Appliquée (Brasserie)	ROQUES	Chimie Minérale
			FERRIER	Mathématiques
	BAUMANN	Physique I° cycle	GILORMINI	Mécanique flui. ISIN
	DURAND	Physique	HILY	Mathématiques P.C.
	GRANGE	Physique (ISIN)	CASTRO	Chimie Organique
	BAVEREZ	Chimie (ENSIC)	DEXHEIMER	Botanique
	CHAMBON	Exploitation Minière (Mines)	NOVERRAZ	Mathématiques
	HUSSON	Physique (ENSEM)	TOURET	Géologie
	WEISSLINGER	Physique	N.....	Maths appliqués
			N.....	Mathématiques
			N.....	Mathématiques
			N.....	Mathématiques
			N.....	Physiologie animale
			N.....	Chimie (ENSIC)
			N.....	Laiterie (Ecole lait.)
			N.....	Chimie Organique
			N.....	Maths appliqués

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. ANARIGLIO - COEURE - DAVRAINVILLE - GIRARDEAU - OVAERT - RUYER - WEBER - PUJOL - SCHREIBER -

TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : STATIONS ET MATERIELS 3

I - TOURBES ACIDES 4

II - TOURBE CALCIQUE 9

III - MOR DE PODZOL 12

IV - SOL BRUN CALCAIRE 14

V - CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES DES SOLS ETUDIES 15

CHAPITRE II : ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE, PAR MESURES RESPIROMETRIQUES 19

I - METHODES 19

1 - Mesure de l'absorption d'oxygène 19
2 - Mesure du dégagement de gaz carbonique 22
3 - Dispositifs expérimentaux 25
4 - Unités 25
5 - Principe de l'interprétation 27

II - RESULTATS 27

1 - Expérience n° 1 ; Comparaison des activités cellulolytique et CMClytique dans les différents sols non enrichis en éléments minéraux 27

2 - Expérience n° 2 : Influence de l'adjonction de N ou P sur l'activité cellulolytique mesurée par l'absorption d'O_2 29

3 - Expérience n° 3 : Influence de l'adjonction de N, P et $CaCO_3$ sur l'activité cellulolytique mesurée par le dégagement de CO_2 33

III - DISCUSSION 35

Page

IV - CONCLUSION 41

CHAPITRE III : ETUDE ENZYMATIQUE 43

I - GENERALITES 43

II - METHODES DE DOSAGES ENZYMATIQUES 44

1 - Mise au point d'une méthode de dosage de C_1 et C_x 44

A - Substrats 45

B - Choix des conditions d'incubation 45

a - Effet du merthiolate 45

b - Choix du pH 46

c - Choix des concentrations en substrat et du temps de réaction 48

d - Protocole retenu pour le dosage de C_1 et C_x 52

C - Etude qualitative et quantitative des produits de la réaction 53

a - Etude qualitative des sucres réducteurs formés 53

b - Etude quantitative 58

(1) dosage des hydrates de carbone soluble 58

(2) dosage des sucres réducteurs . 58

(3) dosage du glucose 60

2 - Dosage des autres enzymes étudiés 63

A - Dosage de la B-glucosidase 63

B - Dosage de la phosphatase 64

C - Dosage de l'uréase 67

III - DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LA TENEUR DES SOLS EN ENZYMES 69

IV - RESULTATS 71

A - Etude de l'équipement enzymatique des sols 71

B - Etude expérimentale de l'influence de l'adjonction de cellulose avec ou sans N ou P sur la teneur en C_1, C_x et β-glucosidase 71

V - DISCUSSION ET CONCLUSION 82

Page

CHAPITRE IV : COMPETITION ENTRE LA MICROFLORE CELLULOLYTIQUE ET LA MICROFLORE NON CELLULOLYTIQUE DANS LES SOLS ORGANIQUES. 88

I - ETUDE DE L'ANTAGONISME PAR COMPETITION POUR N ET P .. 88

1 - Matériel et méthodes 88
A. Matériel 88
B. Techniques d'étude de la compétition pour N et P 88

2 - Résultats 94
A. Compétition pour N 94
B. Compétition pour P 94

II - ETUDE DE L'ANTAGONISME PAR ANTIBIOTISME 98

1 - Test préliminaire 98

2 - Mise en évidence de phénomènes d'antibiotisme dans des modèles simplifiés 100

III - CONCLUSION 102

CHAPITRE V : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE DEUX MECANISMES NON BIOLOGIQUES AGGRAVANT LES CARENCES EN N et P DANS LES SOLS ORGANIQUES. 103

I - METHODES 103

1 - Mesure de l'adsorption et de la désorption de l'ion NH_4^+ 103

2 - Mesure de la rétention de P 104

II - RESULTATS 104

III - CONCLUSION 108

CONCLUSION GENERALE 109

I - TOURBE ACIDE 110

II - TOURBE CALCIQUE 111

III - MOR 112

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La matière organique constituant les tourbes peut persister longtemps -des centaines et même des milliers d'années- sans être minéralisée ; mais l'origine de cette stabilité est mal connue : on ne sait même pas s'il s'agit d'une stabilité intrinsèque résultant de la résistance des composés organiques eux-mêmes, ou d'une stabilité extrinsèque conséquence d'un environnement défavorable à la minéralisation (ALEXANDER, 1965).

Si l'on considère cette deuxième hypothèse, on peut envisager l'intervention de trois groupes de facteurs écologiques défavorables :

a - facteurs physiques, par exemple : adsorption, enrobage, incrustation.

b - facteurs chimiques, par exemple : acidité, composés antimicrobiens, carences.

c - facteurs biologiques, par exemple : antibiotisme, compétition.

Le travail que nous présentons ici consiste à examiner quelques facteurs pouvant être à l'origine de la stabilité extrinsèque: acidité, carences en azote ou en phosphore. Nous avons étudié l'incidence de ces facteurs sur la cellulolyse dans deux types de tourbières bien distincts (DUCHAUFOUR, 1965) : des tourbières acides, d'une part, et une tourbière calcique d'autre part. Il nous a semblé intéressant, en outre, d'étendre notre étude à un humus de type mor où l'activité biologique est aussi très réduite et de prendre comme terme de comparaison un horizon de surface d'un sol brun calcaire, biologiquement très actif.

La littérature concernant la cellulolyse dans les tourbières est très sommaire : les auteurs se sont essentiellement consacrés à l'étude de la microflore cellulolytique des tourbes acides (BARJAC, 1955 ; BENE et al., 1965 ; KUSTER, 1965) et non à l'étude de l'activité cellulolytique proprement dite.

En ce qui concerne les mor, signalons un travail récent de KIFFER et MANGENOT (1968).

La cellulolyse dans les tourbes calciques ne semble pas avoir encore été étudiée.

Seuls, quelques travaux ont été publiés sur la cellulolyse dans les sols cultivés et son amélioration sous l'influence de divers apports (MILLER et SCHMIDT, 1963 ; FLORENZANO et al., 1968).

Dans ce travail, nous avons toujours étudié l'action des facteurs écologiques considérés (carences en N ou P, acidité notamment) en distinguant leur effet sur chacune des deux premières étapes de la cellulolyse : (1) transformation du substrat "cristallin" (cellulose brute insoluble) en cellulose soluble sous l'effet de la fraction enzymatique C_1 (2) transformation de la cellulose soluble en oligosides et cellobiose sous l'effet de la fraction enzymatique C_x. Dans certains cas, nous avons même examiné la troisième étape : transformation du cellobiose en glucose sous l'effet de la β-glucosidase. Notre effort a consisté éventuellement à faire une étude expérimentale portant

(1) Sur les sols eux-mêmes dont l'activité cellulolytique a été mesurée à l'aide de méthodes respirométriques (2ème partie) ou en faisant appel à des techniques de mesure d'activité enzymatique (3ème partie).

(2) Sur des modèles constitués par des milieux liquides ensemencés avec des microflores complexes ou des microorganismes cellulolytiques isolés (4ème partie).

Chapitre I - STATIONS ET MATERIELS

.....

I. TOURBES ACIDES

1 - Généralités

Les tourbières acides d'altitude ont en général pour origine, dans les Vosges, une dépression qu'occupe un étang alimenté par les eaux de précipitation et de fonte des neiges. L'étang est envahi progressivement par la végétation (Equisetum, Eriophorum, etc...) et des débris organiques. Dans une deuxième phase s'installent des Sphagnum qui forment de vastes tapis : la tourbière est constituée avec tout son cortège floristique caractéristique (Polytrichum strictum, P. commune, Carex rostrata, etc...). Par bombement et drainage naturel ou artificiel, la tourbière s'assèche assez pour permettre l'installation de Dicranum, Aulocomnium palustre puis Hypnum splendens et peu à peu se constitue une lande à Myrtilles et Callunes.*

La formation de tourbières est favorisée dans les Vosges par l'abondance des précipitations (1650 mm à Gérardmer, 1950 mm à La Bresse, moyennes 1921-1950 d'après ROTHE et HORRENSCHNEIDER), les basses températures (il gèle 159jours par an sur les crêtes) et la neige (elle ne disparait qu'en mai du massif du Hohneck).

2 - Tourbière acide du Hohneck

La tourbe étudiée a été prélevée près du Chalet Universitaire du Haut Chitelet, sur la route du col de la Schlucht au Hohneck, à une altitude de 1220 m environ (Figure 1).

La roche-mère est un granite leucocrate. La végétation comporte les espèces suivantes :

Végétaux ligneux :

Picea exelsa

Betula verrucosa

---

* Les deux tourbières acides étudiées représentent deux termes de cette évolution par drainage.

Végétation herbacée :

Vaccinium vitis idaea

Vaccinium myrtillus

Vaccinium uliginosum

Vaccinium oxycoccos

Trichophorum sp.

Calluna vulgaris

Andromeda polifolia

Eriophorum vaginatum

Eriophorum angustifolium

Viola palustris

Potentilla tormentilla

Comarum palustre

Caltha palustris

Cardamine amara

Le profil atteint 1,5 m par endroit ; à sa partie inférieure (figure 2), un horizon brun jaunâtre ; au-dessus, l'horizon H est rempli de racines vivantes.

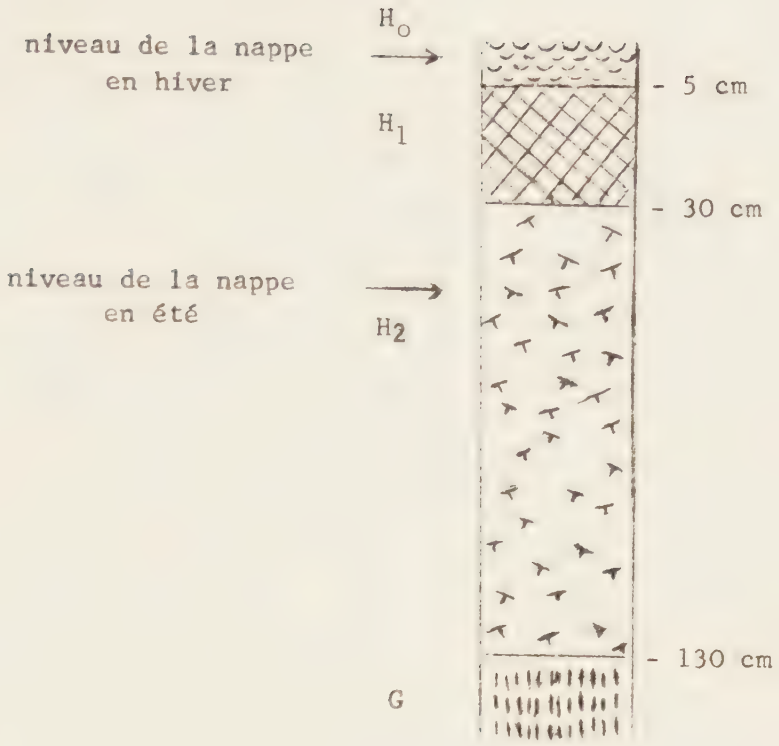


Figure 2 - Profil de la tourbe acide du Hohneck

H_o : Sphaigne.

H_1 : Tourbe noire, texture spongieuse ; très abondant chevelu de racines.

H_2 : Tourbe brun foncé, formée par des matières non-décomposées et des débris des racines, ou de bois enterré.

G : Gley.

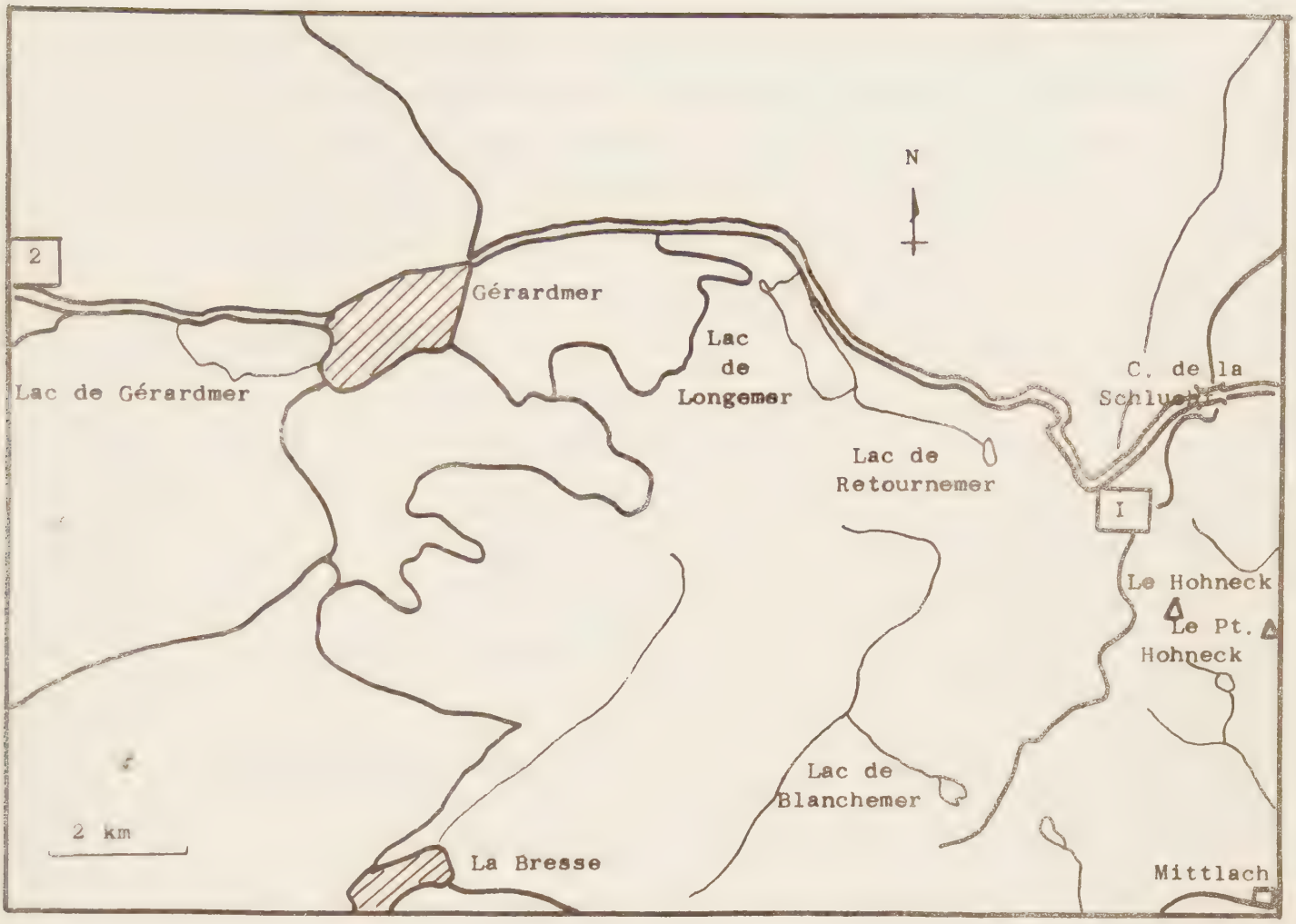


Fig. I - Situation des tourbières acides étudiées.

I Tourbe acide du Hohneck

2 Tourbe acide du Beillard

3 - Tourbière acide du Beillard

La tourbière du Beillard est située sur le versant occidental du Hohneck, à 4 km de Gérardmer, sur la route du Tholy, sur un substratum d'alluvions glaciaires siliceuses, à 600 m d'altitude (figure 1). Depuis longtemps, sa tourbe est exploitée comme matériau de chauffage, ce qui a produit un important drainage. Sa surface est envahie par la bruyère et divers arbres :

Végétation ligneuse :

Picea excelsa
Betula verrucosa
Alnus glutinosa
Salix aurita
Pinus sylvestris
Pinus uncinata

Végétation herbacée :

Vaccinium vitis idaea
Vaccinium uliginosum
Vaccinium oxycoccos
Andromeda polifolia
Calluna vulgaris
Eriphorum vaginatum
Drosera rotundifolia
Drosera intermedia
Molinia coerulea

Les mousses sont moins abondantes que dans la station précédente et la bruyère y prédomine nettement ; le profil est un peu plus épais (2m) et remarquable par l'abaissement du niveau de la nappe dû au drainage (figure 3).

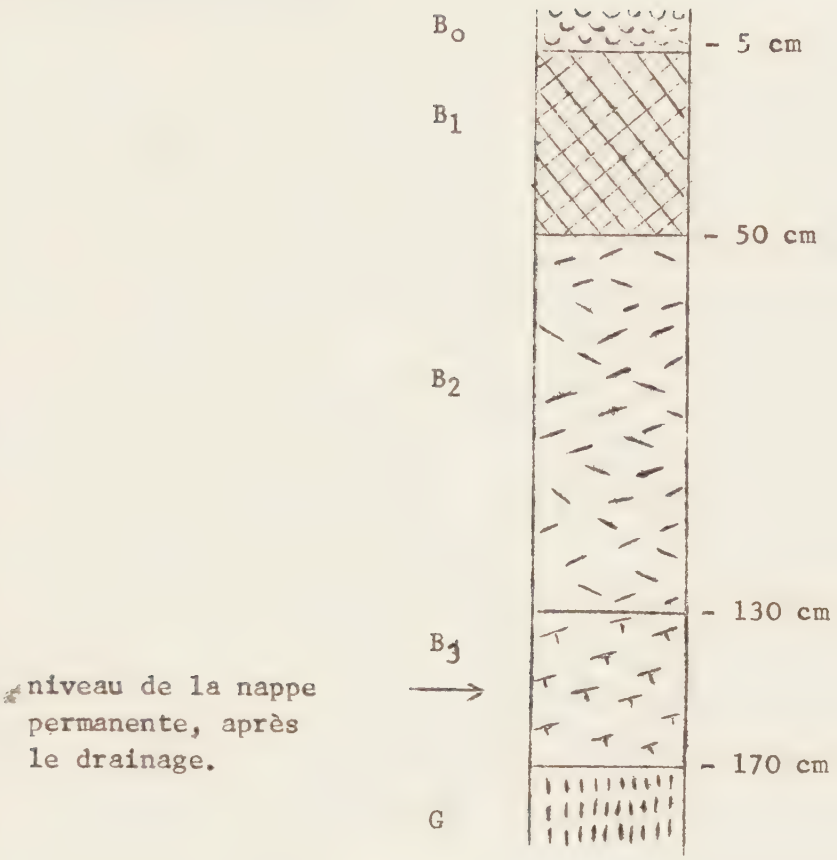


Figure 3 - Profil de la tourbe acide du Beillard.

B_o : Mélange de Sphaigne avec des racines de Calluna vulgaris.

B_1 : Couche superficielle, texture grossière, et bien fibreuse, brune, présence de chevelu très dense de racine.

B_2 : Tourbe noire, texture feuilletée, grasse, absence de racines de végétaux.

B_3 : Tourbe moins décomposée que la précédente. Présence de végétaux presque intacts, jaunâtres.

G : Gley, sable limoneux, jaune foncé, nappe permanente.

II. TOURBE CALCIQUE

Le marais de Saint-Gond, à 25 km au sud d'Epernay, constitue une vaste dépression en forme de vallée entre des buttes de craie que dominent des lambeaux de meulières à la Montagne de Toulon au nord, au Mont Aout au sud. Au centre de la dépression s'étale une vaste nappe de "grève" crayeuse recouverte par une couche de tourbe. (fig. 4).

La tourbe a été extraite de cette tourbière depuis 1840, d'abord comme matériau de chauffage, puis comme matière première pour une fabrique de terreau. Elle est spongieuse, humifère, noire ; elle contient du calcaire et son pH est en général supérieur à 7. La tourbière est inondée chaque année pendant quelques mois ; sa surface, couverte de roselières épaisses, porte quelques bouquets de frênes et d'aulnes le long des fossés de drainage. Dans les secteurs les mieux drainés, quelques champs de maïs fourrager se sont développés.

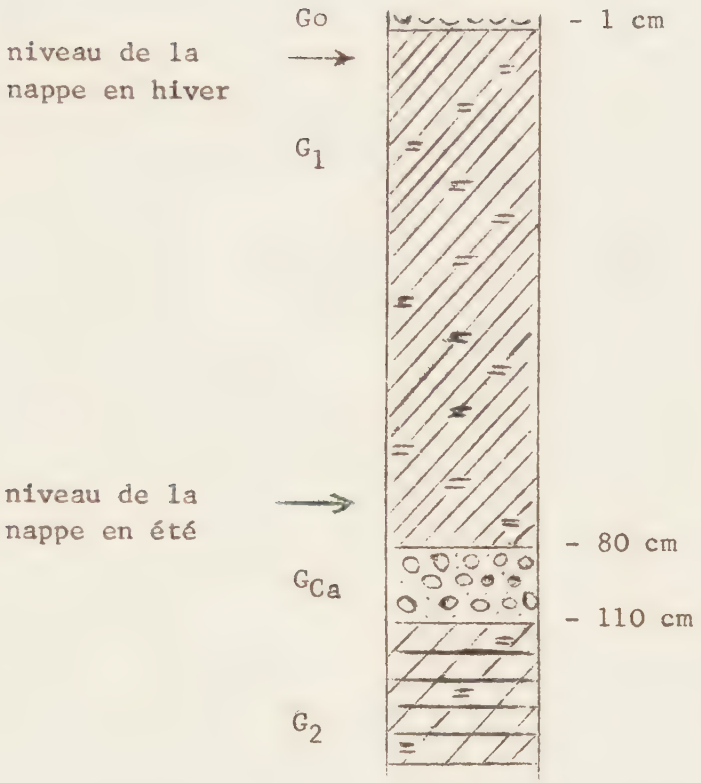


Figure 5 - Profil de la tourbe calcique de Saint-Gond.

G_o : Débris de maïs, peu épais.

G_1 : Tourbe calcique noire, de texture spongieuse, légère ; nombreux nodules calcaires. Racines de maïs très abondantes.

G_{Ca} : Dépôt de sable calcaire, plus ou moins pâteux, submergé d'eau, qui semble être le produit de l'érosion latérale.

G_2 : Couche profonde, texture fibreuse, serrée, peu décomposée. Les débris végétaux semblent être incorporés à l'argile, brune, gorgée d'eau (nappe permanente).

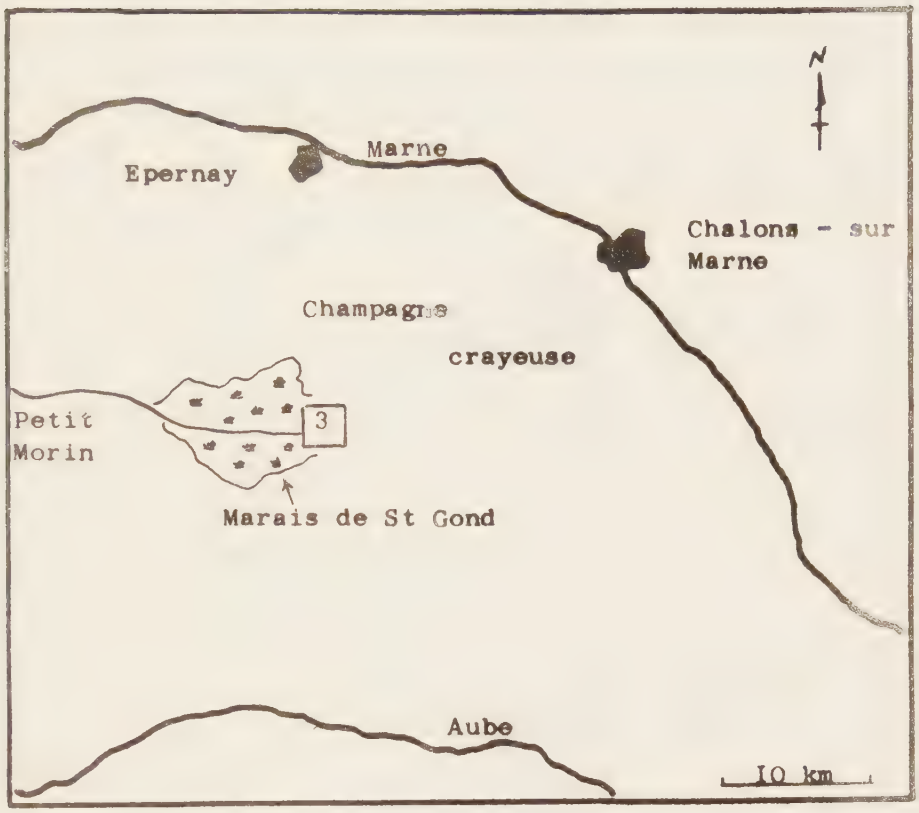


Fig. 4 - Situation de la tourbière calcique étudiée.

3 lieu de prélèvement

III. MOR DE PODZOL

L'humus brut de type mor, choisi pour notre étude, a été prélevé dans la forêt de Nompatelize (Vosges) à 7 km à l'est d'Autrey (Figure 6) ; il y constitue l'horizon de surface d'un podzol humoferrugineux développé sur grès vosgien, sous le couvert d'une sapinière à myrtilles et callunes, altitude 450 m).

Le profil est décrit selon DUCHAUFOUR (1965) à la figure 7 .

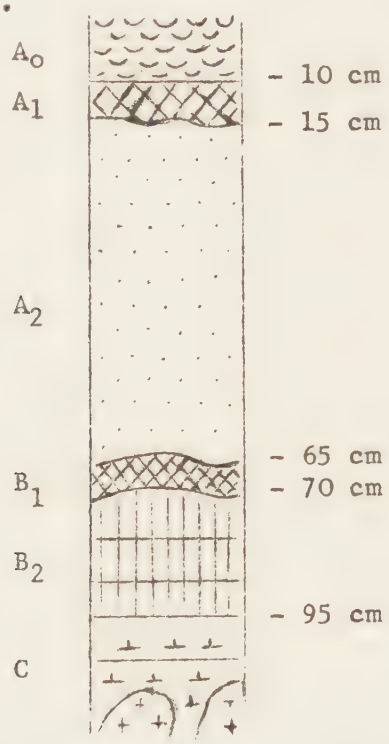


Figure 7 - Profil d'un Podzol humo-ferrugineux de la forêt de Nompatelize (Vosges)

A_o : Mor brunâtre, feuilleté, épaisseur de 10 cm. Présence de racines très denses de Vaccinium myrtillus.

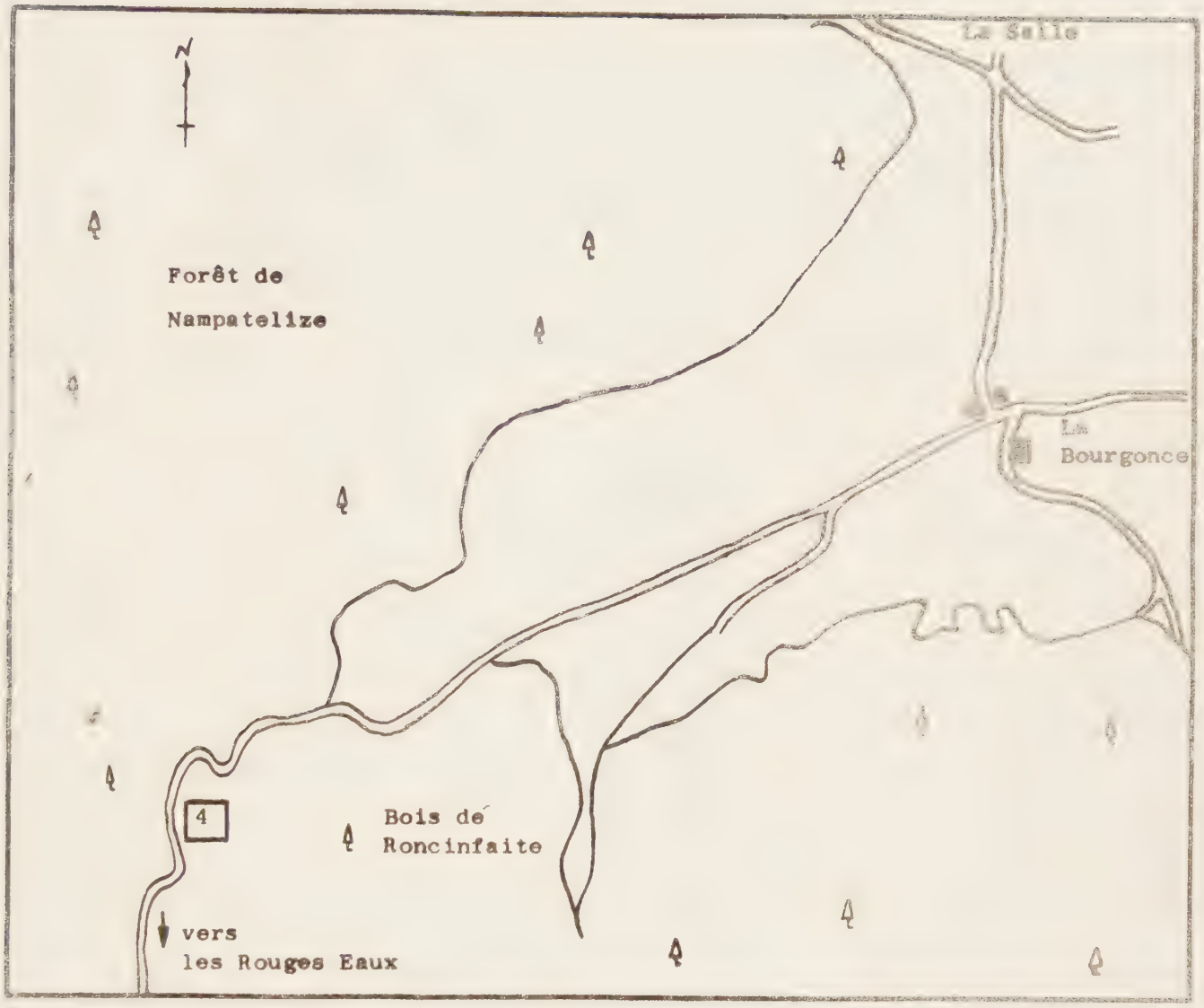
A_1 : Horizon peu épais, noir, riche en matière organique.

A_2 : Très épais, blanchâtre, sableux.

B_1 : Très mince, 5 cm, noir, accumulation de matière humique, meuble.

B_2 : Horizon ferrugineux, durci, ocre-rouille, très épais, caillouteux.

C : Roche mère, grès vosgien.



Carte Rambervillers 7-8 I/25 000

Fig. 6 - Situation du Mor étudié

4 Lieu de prélèvement

IV. SOL BRUN CALCAIRE

Ce sol, étudié à titre de comparaison, fut prélevé dans un champ de céréales (en rotation avec des légumineuses) de l'ancienne ferme expérimentale du Montet à Vandoeuvre-les-Nancy (Meurthe et Moselle). Le substratum est un colluvium de calcaire jurassique.

Le profil est décrit selon DUCHAUFOUR (1965), à la figure 8.

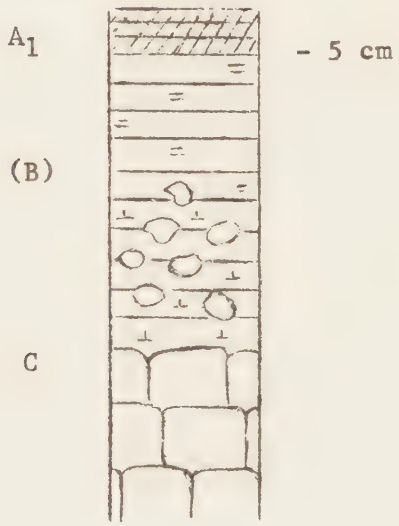


Figure 8 - Profil du sol brun calcaire du Montet.

A_1 : peu épais, mull de pelouse, structure grummeleuse ; présence de racines de gramminées très abondantes.

(B) : limoneux, présence de cailloux calcaires dans le profil.

C : roche mère : calcaire jurassique.

V. CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES DES SOLS ETUDIES

1 - Analyses physicochimiques

Le tableau I rassemble les résultats des analyses effectuées. Les deux types de tourbes s'y montrent extrêmement différents, non seulement par le pH, le taux de saturation, le C/N, mais aussi par leur teneur en N et P assimilables par les végétaux : la tourbe acide ne possède pas de nitrates, même en surface ; la tourbe calcique, si elle possède des nitrates, au moins en surface, renferme encore moins de phosphore assimilable que les tourbes acides.

Le mor se rapproche des tourbes acides avec toutefois un rapport C/N plus bas.

Quant au sol brun calcaire, il diffère surtout de la tourbe calcique par sa plus faible teneur en calcium échangeable et sa teneur élevée en phosphore assimilable.

2 - Analyses biologiques

Les analyses biologiques du tableau II montrent la faible teneur en microorganismes des tourbes acides et aussi du mor. La tourbe calcique est exceptionnellement riche en bactéries. Le nombre de champignons et d'actinomycètes augmente quand on passe des tourbes acides à la tourbe calcique, de celle-ci au mor et au sol brun calcaire.

3 - Cellulolyse in situ

Cette étude biologique préalable fut accompagnée d'une mesure de la cellulolyse sur le terrain, dans la tourbière du Hohneck ; pour cela, des disques de papier filtre (Durieux III) protégés par de la laine de verre et serrés entre deux plaques métalliques évidées, furent placées à différents niveaux du profil, au mois de Novembre, avant que l'eau ne gèle. Les disques furent prélevés au bout de 9 mois et pesés (tableau III) : bien qu'une légère attaque se soit produite, marquée par des taches brunes, la perte de poids n'a dépassé en aucun cas 11 %. A titre de comparaison, un papier filtre analogue, placé à la surface d'un échantillon du sol brun calcaire du Montet, a complètement disparu après un mois de séjour à l'étuve à 28° C.

Tableau I - CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES SOLS ETUDIES

Type de sol	Provenance	Profondeur en cm	Référence	pH	C (10^{-2})	N (10^{-2})	C/N	Complexe absorbant mé. pour 100 g						N ammoniacal en fonction du sol sec à l'air (10^{-6})	N nitrique en fonction du sol sec à l'air (10^{-6})	P assimilable en fonction du sol sec à l'air (10^{-6})
								Ca	Mg	K	S	T	S/Tx100			
Tourbes acides	Beillard	20-30	B_1	3,2	50,0	1,15	43,5	5,3	4,4	0,7	10,4	130	8	43	0	29
		50-70	B_2	3,6	55,6	1,16	48,0	4,6	3,6	0,1	8,3	119	7	31	0	25
	Hohneck	10-20	H_1	3,1	58,5	1,95	30,0	2,7	0,9	0,6	4,2	114	3,7	80	0	30
		50-70	H_2	3,2	53,5	1,47	36,4	3,3	0,9	0,6	4,8	101	4,7	83	0	19
Tourbe calcique	Saint Gond	20-40	G1	7,3	42,5	2,41	17,6	155,0	1,0	0,2	156,2	151	sat.	36	125	19
		120-130	G_2	6,9	43,4	1,81	24,0	131,0	1,5	0,3	132,9	132	sat.	29	0	19
Mor sur podzol	Nompatelize	0-8	MOR	3,0	42,0	1,25	33,6	3,5	2,4	1,3	7,2	110	6,6	32	0	28
Sol brun calcaire	Montet	0-10	SBC	7,5	2,9	0,24	12,0	32,0	0,9	0,7	33,6	19	sat.	32	43	69

N.B. Les résultats sont exprimés en fonction du sol sec à l'air.

Tableau II - DENSITE DES BACTERIES, ACTINOMYCETES et CHAMPIGNONS DANS LES SOLS ETUDIES.

Type de sol	Provenance	Profondeur en cm	Référence	Microflore totale bactérienne en unités par g de sol sec à l'air	Actinomycètes en unités par g de sol sec à l'air	Champignons en unités par g de sol sec à l'air
Tourbes acides	Beillard	20 - 30	B_1	420 000	1 500	8 000
	Hohneck	10 - 20	H_1	1 000 000	2 000	16 000
Tourbe calcique	St Gond	20 - 40	G_1	45 400 000	4 000	114 000
Mor sur podzol	Nompatelize	0 - 8	M R	3 400 000	146 000	312 000
Sol brun calcaire	Montet	0 - 10	SB C	14 000 000	3 200 000	440 000

Tableau III - PERTES EN POIDS DE DISQUES DE PAPIER FILTRE MIS EN PLACE DANS LA TOURBIERE ACIDE DU HONNECK (LES PERTES SONT EXPRIMEES EN POURCENTAGE PAR RAPPORT AU POIDS INITIAL)

Répétition	Horizon H_1 15 cm	Horizon H_2 50 cm	Horizon H_3 100 cm
1	4,05	9,30	9,30
2	4,46	2,31	9,10
3	5,65	6,85	11,00
4	4,20	10,00	6,60
5	8,95	1,60	1,45
Moyenne	5,46	6,00	9,36

Chapitre II - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE, PAR MESURES RESPIROMETRIQUES.

.....

I. METHODES

1 - Mesure de l'absorption d'oxygène

A. Principe et description du macrorespiromètre électrolytique

HARRIS (1966) a mis au point un respiromètre électrolytique simple, qui permet d'opérer sur une quantité assez grande de sol, ce qui est nécessaire pour l'étude d'un milieu peu actif tel que la tourbe.

Le principe original consiste à maintenir constante la pression partielle en oxygène : pour cela, l'atmosphère du compartiment A (figure 9) où se fait l'incubation est reliée par le tube T avec le compartiment B qui n'est autre qu'un compartiment à électrolyse dont l'anode est dans le tube T, légèrement au dessus du niveau général de la solution électrolytique E ; une consommation d'oxygène en A produit une dépression, le liquide du compartiment B monte dans le tube T ; quand il atteint l'anode, le circuit électrique se ferme et l'électrolyse de E produit de l'oxygène qui se dégage dans le tube T jusqu'à ce que la pression totale en A revienne à son niveau initial : le liquide de B redescend alors dans le tube T, coupant le contact et arrêtant l'électrolyse.

La quantité d'oxygène ainsi produite est proportionnelle à la quantité de courant qui a traversé le circuit.

Pour la mesurer, HARRIS a imaginé de mettre un second compartiment à électrolyse C en série dans le circuit et de mesurer la quantité de gaz (O_2 et H_2) qui s'y dégage sous l'action du courant électrique.

Dans le compartiment A, un bécher S contient une solution 2 N de potasse pour absorber le gaz carbonique dégagé par le sol.

Dans le compartiment B, la cathode est en cuivre et l'anode en platine ; la solution électrolytique E est une solution saturée de sulfate de cuivre dans l'eau, additionnée de 1 % d'acide sulfurique N.

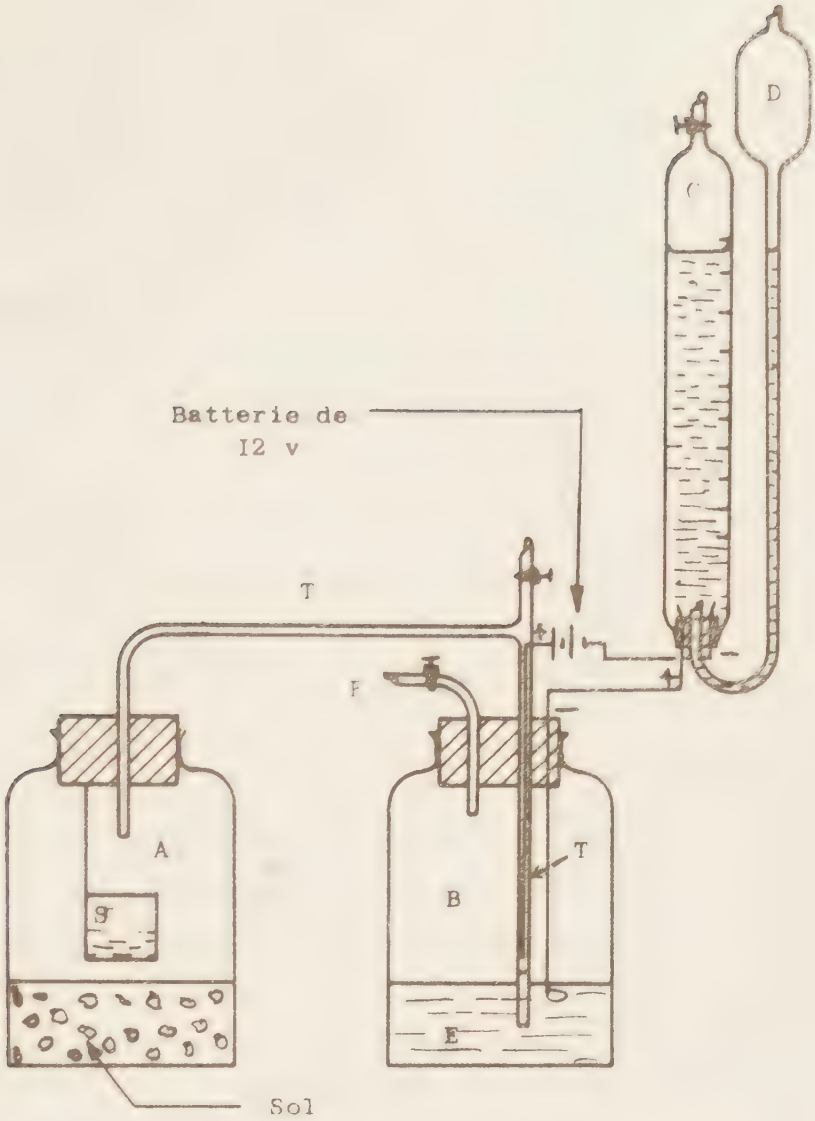


Fig. 9 Microrespiromètre électrolytique (d'après Harris, 1966)

A : Chambre de respiration
B : Ier compartiment à électrolyse
C : 2è compartiment à électrolyse
D : Pipette de réglage de niveau
T : Tube de raccordement
E : Solution électrolytique
F : Robinet d'équilibrage
G : Solution de Potasse.

Le deuxième bac à électrolyse (C) est une éprouvette graduée de 250 ml contenant de l'acide sulfurique N. Les électrodes de ce compartiment sont en fil de platine.

FONCTIONNEMENT :

Etat initial :

$$V_1 = V_2$$
$$P_1 = P_2$$

où V_1, P_1 sont les volume et pression du compartiment A ;
V_2, P_2 sont les volume et pression du compartiment B.

Si l'on assimile l'air à un gaz parfait :

$$V_1 P_1 = nRT = V_2 P_2$$

T = constante (isotherme) ;

R = constante de gaz ;

n = nombre de moles de l'air.

Etat instantané : En présence d'un sol dans le compartiment A. L'oxygène est absorbé par les microorganisms du sol.

$$P_1 \longrightarrow P'_1 < P_1$$

$$P'_1 = \frac{n'_1 RT}{V_1} \qquad n'_1 < n_1$$

où $n_1 - n'_1$ = moles d'O_2 absorbées par le sol.

n_1 = moles de gaz dans le compartiment A

Etat instantané suivant : $P'_1 \longrightarrow P_1$, $n'_1 \longrightarrow n_1$

$$P_1 = \frac{n_1 RT}{V_1} ,$$

où $n_1 - n'_1$ = moles d'O_2 produit par l'anode dans T.

Dans le compartiment B, il y a électrolyse du $CuSO_4$:

- sur la cathode : deux électrons neutralisent un ion Cu^{++} et du cuivre se dépose.

$$Cu^{++} + 2\,e^- \longrightarrow Cu\downarrow$$

- sur l'anode : l'oxygène laisse deux électrons, et se dégage sous forme gazeuse.

$$H_2O \longrightarrow \tfrac{1}{2}\,O_2\uparrow + 2\,H^+ + 2e^-$$

Cette réaction n'entraîne pas la formation d'hydrogène si l'on prend la précaution (1) d'utiliser du cuivre très pur (2) de saturer la solution en $CuSO_4$ (3) de placer la cathode en surface.

Dans le compartiment C, il y a électrolyse de l'eau :

- sur la cathode : il y a dégagement d'hydrogène ;
- sur l'anode, dégagement d'oxygène :

$$H_2O \longrightarrow H_2\uparrow + \tfrac{1}{2}\,O_2\uparrow$$

Pour un courant ayant restitué en A un volume d'oxygène il se forme un volume d'oxygène et deux d'hydrogène : le volume des gaz produits en C est donc le triple du volume d'oxygène consommé en A.

B.- Mesures

Les mesures ont été faites sur des échantillons de 100 g de sol frais, amenés à la capacité au champ, soit respectivement 300 %, 455 %, 596 %, 624 %, 400 %, 566 %, 270 % et 22 % pour les sols B_1, B_2, H_1, H_2, G_1, G_2, Mor, SBC.

2 - Mesure du dégagement de gaz carbonique (DOMMERGUES, 1960)

A. Mesure

La mesure se fait sur des échantillons de 10 g en bocal à canette ; sur le sol est placé un cristallisoir de 30 ml contenant 10 ml de soude N. Les incubations étaient poursuivies 7 jours à 28° C.

Chaque essai était mené en triple exemplaire, le témoin étant la soude soumise à la carbonatation de l'atmosphère dans un bocal sans sol.

B. Apports de cellulose, carboxyméthylcellulose, $CaCO_3$, N, P (Tableau IV)

Les enrichissements ont été effectués avec les produits suivants :

- cellulose : poudre de cellulose pour chromatographie Durieux
- carboxyméthylcellulose (CMC) : Blanose R 190 Pronoval
- $CaCO_3$ précipité pr. anal. (Merk)
- N sous forme de $(NH_4)_2 SO_4$
- P sous forme de $K_2 HPO_4$

(1) Expériences fondées sur l'absorption d'O_2 (expériences n°1 & 2)

Les apports de cellulose ou carboxyméthylcellulose (CMC) ont été effectués aux doses de 2 % par rapport au poids de sol humide, ce qui représente pour la tourbe acide, la tourbe calcique, le mor de podzol, le sol brun calcaire, des apports respectifs de 13,3 ; 10,0 ; 7,4 ; 2,44 % par rapport au poids sec de ces sols. Les apports de $(NH_4)_2 SO_4$ et $K_2H PO_4$ ont représenté le centième des apports de cellulose ou CMC. Lorsqu'ils ont lieu, les apports de $CaCO_3$ ont été identiques aux apports de cellulose ou de CMC.

(2) Expériences fondées sur le dégagement de CO_2 (expérience n°3)

Les apports de cellulose ou CMC effectués lors des expériences précédentes se sont révélés trop élevés, car ils perturbent gravement l'équilibre chimique des sols (notamment le C/N) et leurs propriétés physiques (notamment la capacité de rétention). Aussi a-t-on été amené à réduire ces apports à 2,50 % (dose exprimée par rapport au poids sec des sols). En ce qui concerne l'azote minéral, on l'ajoute à une dose telle que le mélange cellulose (ou CMC) et $(NH_4)_2 SO_4$ présente un rapport $\frac{C}{N}$ de l'ordre de 50, c'est-à-dire un rapport $\frac{C}{N}$ voisin de celui qui caractérise les sols organiques étudiés (cf. tableau I).

Tableau IV - DOSE DE CELLULOSE, CMC, $CaCO_3$, N, P APPLIQUES POUR L'ENRICHISSEMENT DES SOLS (DOSES EXPRIMEES EN POURCENTAGE EN FONCTION DU SOL SEC A L'AIR).

Sols	$CaCO_3$	Cellulose CMC	$(NH_4)_2 SO_4$ K_2HPO_4	Expérience portant sur :
Tourbe acide H_1	13,3	13,3	0,13	Absorption d'O_2
	10	2,5	0,10	Dégagement de CO_2
Tourbe calcique G_1	0	10,0	0,10	Absorption d'O_2
	0	2,5	0,10	Dégagement de CO_2
Mor de podzol MR	7,4	7,4	0,07	Absorption d'O_2
	10	2,5	0,10	Dégagemebt de CO_2
Sol brun calcaire SBC	0	2,44	0,024	Absorption d'O_2
	0	2,5	0,10	Dégagement de CO_2

Remarque :

Une expérience préliminaire (tableau V) ayant montré que l'adjonction de S sous forme de K_2SO_4 ne modifiait pas l'intensité de la cellulolyse dans la tourbe acide H_1, on a considéré que l'apport d'azote pouvait se faire sous forme de $(NH_4)_2 SO_4$ sans risquer d'introduire "un effet S" dans l'expérimentation.

3 - Dispositifs expérimentaux

En dehors de quelques expériences -notamment l'expérience préliminaire concernant l'adjonction de S et l'expérience ayant pour but la comparaison des activités cellulolytiques et la CMC lytiques (expérience n° 1)- on a adopté des dispositifs de type factoriel avec 2 ou 3 répétitions :

- Dispositif factoriel de type 2^2 : mesure de l'absorption d'O_2 (expérience n° 2)

Deux groupes de facteurs ont été étudiés séparément : apport de cellulose et apport d'azote d'une part, apport de cellulose et apport de phosphate d'autre part.

- Dispositif factorial de type 2^4 : mesure du dégagement de CO_2 (expérience n° 3)

On a étudié simultanément les 4 facteurs : apport de cellulose, apport d'azote, apport de phosphore, apport de $CaCO_3$.

Les résultats de ces expériences factorielles n° 2 et n° 3 ont été analysés suivant la méthode simplifiée proposée par BECK et al. (1969).

4 - Unités

L'absorption d'oxygène est exprimée en ml d'oxygène absorbé en 10 jours par un poids de sol correspondant à 1 g de C du sol.

Le dégagement de CO_2 est exprimé en mg de CO_2 dégagé en 7 jours par 1 g de sol sec.

Tableau V - INFLUENCE DU SOUFRE APPORTE SOUS FORME DE K_2SO_4 SUR L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DE LA TOURBE ACIDE H_1 MESUREE PAR LE DEGAGEMENT DE CO_2.

(exprimé en mg CO_2 dégagé en 7 jours par 1g de sol sec à l'air)

	Doses de S apportées à la tourbe en 10^{-6} (en fonction du poids de sol sec à l'air)					
	0	5	10	20	40	200
Aucun apport de cellulose	6,00	-	5,75	6,14	-	5,95
Apport de cellulose à la dose de 2×10^{-2} (en fonction du poids de sol sec à l'air)	7,60	7,00	8,40	7,66	7,66	8,00

N.B. Les chiffres correspondent à la moyenne de 3 répétitions.

5 - Principe de l'interprétation

Nous négligeons l'intervention éventuelle d'un priming effect (effet d'activation) et nous admettons que l'accroissement d'activité respiratoire consécutif à l'enrichissement en cellulose (ou en CMC) est directement lié à l'activité cellulolytique (ou CMC lytique) dans le sol considéré.

L'accroissement d'activité respiratoire dû à l'enrichissement en cellulose (donc à la cellulolyse) est défini par la différence

$$R = DC - D$$

où DC représente l'activité respiratoire (absorption d'O_2 ou dégagement de CO_2) des sols enrichis en cellulose et D l'activité respiratoire correspondante des sols témoins (non enrichis en cellulose).

On définit de même l'accroissement d'activité respiratoire dû à l'enrichissement en CMC (donc à la CMClyse) :

$$R' = DCMC - D$$

où DCMC représente l'activité respiratoire des sols enrichis en CMC et D l'activité respiratoire correspondante des sols témoins (non enrichis en CMC).

Dans le cas où l'activité respiratoire est mesurée par l'absorption d'O_2, l'accroissement d'activité respiratoire est désigné par RO_2 ; dans le cas du dégagement de CO_2, on utilise la désignation RCO_2.

II. RESULTATS

1 - Expérience n° 1 : Comparaison des activités cellulolytique et CMClytique dans les différents sols non enrichis en éléments minéraux

Les figures 10 et 11 montrent clairement que la CMClyse est toujours plus active que la cellulolyse.

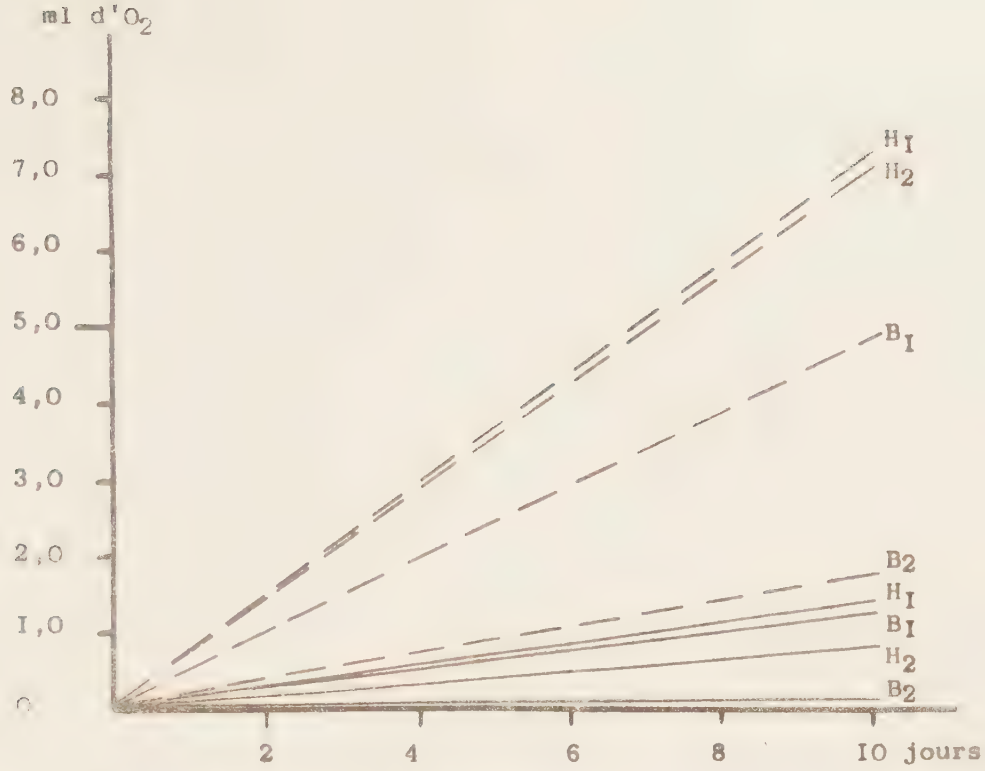


Fig. 10 - Comparaison de la dégradation de la cellulose (en trait plein) et de CMC (en trait pointillé) dans deux tourbes acides (H_I, B_I : hor. sup. ; H_2, B_2 : hor. profond).
Les résultats sont rapportés en ml d'O_2 absorbés par g de carbone du sol.

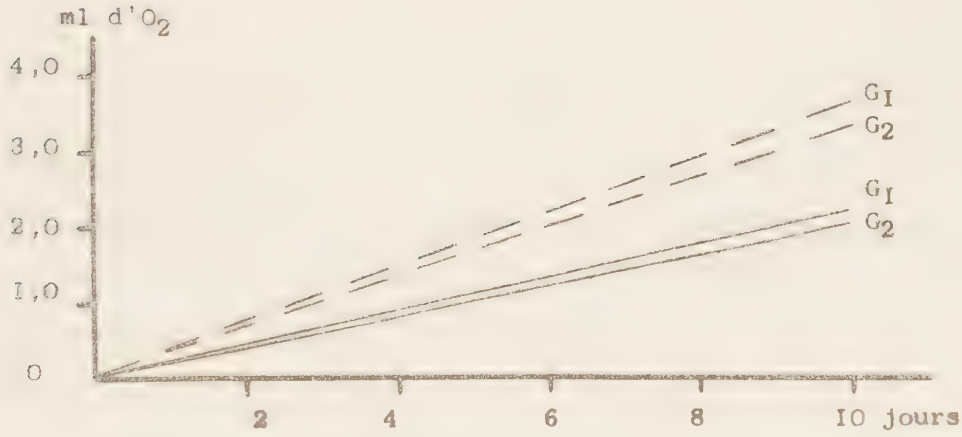


Fig. 11 - Comparaison de la dégradation de la cellulose (en trait plein) et de CMC (en trait pointillé) dans deux horizons de tourbe calcique (G_I hor. supérieur ; G_2 : hor. profond).
Les résultats sont rapportés en ml d'O_2 absorbés par g de carbone du sol.

Pour faciliter la comparaison des différents types de sols, on a calculé pour chacun d'eux le rapport suivant (tableau VI) :

"accroissement de l'absorption d'O_2 dû à l'enrichissement en cellulose RO_2 : accroissement de l'absorption d'O_2 dû à l'enrichissement en CMC ($R'O_2$). Pour tous les sols ce rapport $\frac{RO_2}{R'O_2}$ est inférieur à 1, ce qui veut dire que la dégradation de la CMC est toujours plus rapide que celle de la cellulose. D'autre part, on constate que les sols peuvent se classer en deux catégories :

(1) ceux dont le rapport $\frac{RO_2}{R'O_2}$ est supérieur à 0,50 : tourbes calciques et sol brun calcaire.

(2) ceux dont le rapport $\frac{RO_2}{R'O_2}$ est inférieur à 0,50 : tourbes acides, mor de podzol.

2 - Expérience n° 2 : Influence de l'adjonction de N ou P sur l'activité cellulolytique mesurée par l'absorption d'O_2

Les résultats de cette expérience sont portés sur les figures 12, 13, 14, 15 et le tableau VII (partie supérieure). L'analyse statistique des données, dont les moyennes figurent à ce tableau met en évidence les interactions suivantes hautement significatives (P = 0,01). Rappelons que les chiffres figurant ci-dessous correspondent à des absorptions d'O_2 exprimées en ml d'O_2. absorbés en 10 j par 1 g de C du sol.

α. Tourbe acide du Hohneck (H_1)

Interaction "cellulose x N"

		Cellulose	
		pas apport	Apport
N	pas d'apport	7,57	8,78
	apport	8,80	18,13

Interaction "cellulose x P"

		Cellulose	
		pas apport	apport
P	Pas d'apport	7,58	8,78
	Apport	9,09	12,87

β. Tourbe calcique de Saint-Gond (G_1)

Interaction "cellulose x P"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	Pas d'apport	4,16	6,46
	Apport	5,28	17,00

γ. Mor de podzol (MR)

Interaction "cellulose x N"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	Pas d'apport	6,68	8,69
	Apport	8,43	12,51

Interaction "cellulose x P"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	Pas d'apport	13,36	17,38
	Apport	15,31	17,02

Tableau VI - COMPARAISON DES ACCROISSEMENTS D'ABSORPTION D'O_2 DUS A L'ENRICHISSEMENT EN CELLULOSE ET CMC DANS LES DIFFERENTS SOLS (Expérience nº 1)

	Types pédologiques	Référence	Accroissement de l'absorption d'O_2 dû à l'enrichissement en cellulose (RO_2)	Accroissement de l'absorption d'O_2 dû à l'enrichissement en CMC ($R'O_2$)	$\frac{RO_2}{R'O_2}$
Sols organiques	Tourbes acides	B_1	I,34	4,95	0,27
		B_2	0,I0	I,80	0,06
		H_1	I,45	7,40	0,20
		H_2	0,85	7,20	0,I2
	Tourbes calciques	G_1	2,30	3,65	0,63
		G_2	2,20	3,20	0,69
	Mor de podzol	MR	2,20	9,I6	0,24
Sol non organique	Sol brun calcaire	SBC	I6,30	28,80	0,56

NB : Les définitions de RO_2 et $R'O_2$ sont données dans le texte. Les sols n'ont reçu aucune adjonction de N, P ou $CaCO_3$

Tableau VII - INFLUENCE DE L'ADJONCTION DE CELLULOSE, N, P, $CaCO_3$ SUR L'ACTIVITE RESPIRATOIRE DES DIFFERENTS SOLS ETUDIES

	Apports de				Sols organiques			Sol minéral
	Cell.	$CaCO_3$	P	N	Tourbe acide (H_1)	Tourbe calcique (G_1)	Mor de podzol (MR)	Sol brun calcaire (SBC)
Absorption d'O_2 en ml d'O_2 absorbé en 10 jours par 1 g de C du sol.					7,57	4,15	13,35	Non étudié
				X	8,80	4,98	16,86	
			X		9,85	5,27	15,31	
	X				8,77	6,45	17,37	
	X			X	18,12	6,92	25,01	
	X		X		12,87	17,00	17,01	
Dégagement de CO_2 en mg de CO_2 dégagé en 7 jours par 1 g de sol sec					5,96	4,62	7,10	0,89
	X				5,97	5,13	7,49	1,45
		X			27,87		25,57	
	X	X			44,88		32,11	
			X		4,89	5,06	7,83	2,18
	X		X		10,17	7,70	9,12	5,90
		X	X		31,19		17,24	
	X	X	X		34,17		15,38	
				X	4,89	5,13	7,38	1,32
	X			X	5,86	7,55	7,21	11,68
		X		X	41;16		28,79	
	X	X		X	43,71		31,32	
			X	X	4,79	5,57	7,04	2,07
	X		X	X	5,18	12,32	7,94	13,52
		X	X	X	31,97		24,90	
	X	X	X	X	49,18		26,59	

Les chiffres sont la moyenne de 2 répétitions (absorption d'O_2) ou de 3 répétitions (dégagement de CO_2).

3 - Expérience n° 3 : Influence de l'adjonction de N, P, et $CaCO_3$ sur l'activité cellulolytique mesurée par le dégagement de CO_2

Les données dont les moyennes figurent au tableau VII ont fait l'objet de l'analyse statistique dont les résultats sont regroupés ci-dessous. Seuls ont été retenus les résultats hautement significatifs (P = 0,01). Rappelons que les chiffres figurant ci-dessous correspondent à des dégagements de CO_2 exprimés en mg de CO_2 dégagés en 7 j par 1 g de sol sec.

α. Tourbe acide du Hohneck (H_1)

Interaction "cellulose x $CaCO_3$"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
$CaCO_3$	pas d'apport	5,13	6,80
	apport	33,05	42,99

Interaction "N x $CaCO_3$"

		N	
		pas d'apport	apport
$CaCO_3$	pas d'apport	6,75	5,18
	apport	34,53	41,51

β. Tourbe calcique de Saint-Gond (G_1)

Interaction "cellulose x P"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	4,88	6,34
	apport	5,32	10,01

Interaction "cellulose x N"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	pas d'apport	4,84	6,42
	apport	5,35	9,94

γ. Mor de podzol (MR)

Effet de la cellulose : aucun effet principal significatif ; aucune interaction.

Interaction "P x $CaCO_3$"

		P	
		pas d'apport	apport
$CaCO_3$	pas d'apport	7,30	7,98
	apport	29,45	21,03

Interaction "N x $CaCO_3$"

		N	
		pas d'apport	apport
$CaCO_3$	pas d'apport	7,89	7,39
	apport	22,58	27,90

δ. Sol brun calcaire du Montet (SBC)

Interaction "cellulose x N"

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	pas d'apport	3,40	7,45
	apport	1,70	12,60

On constate qu'il n'existe aucun effet principal libre de toute interaction. Quant aux interactions elles-mêmes, nous avons seulement interprété celles où l'apport de cellulose intervenait.

Les données converties en accroissements d'activité respiratoire ont été regroupés au tableau VIII (partie inférieure).

III. DISCUSSION

1 - Limitation de la cellulolyse dans les sols organiques

On a vu clairement qu'*in situ* la cellulolyse était pratiquement inexistante dans la tourbe acide (tableau III). Au laboratoire, cette limitation de la cellulolyse dans les sols organiques ressort également bien de l'expérience fondée sur la mesure de l'accroissement de l'absorption d'O_2 consécutive à l'enrichissement en cellulose (tableau VI). On constate en effet que l'accroissement d'absorption d'O_2 oscille entre 0,10 et 2,30 dans les sols organiques alors qu'il atteint 16,30 dans le sol non organique (fig. I5).

2 - Influence d'apports de N, P, $CaCO_3$ sur la cellulolyse dans les sols organiques (tableau VIII)

α - Tourbe acide

L'expérience n° 2 met en évidence un effet très favorable de l'apport d'N minéral : l'adjonction d'azote à la tourbe acide fait passer l'accroissement de l'absorption d'O_2 de 1,21 à 9,33. L'effet de P est net, mais un peu moins marqué (fig. 12).

L'expérience n° 3 ne confirme pas ces résultats en ce qui concerne l'apport d'N ou P ; quant à l'apport de $CaCO_3$, il fait passer l'accroissement du dégagement de CO_2 de 1,63 à 9,94.

β - Tourbe calcique

Les expériences n° 2 et n° 3 montrent indiscutablement que, dans ce type de sol organique, P minéral soluble est le facteur limitant majeur de la cellulolyse ; ainsi, dans l'expérience n° 2, l'adjonction de P à la tourbe calcique fait passer l'accroissement de l'absorption d'O_2 de 2,30 à 11,72 (fig. 13).

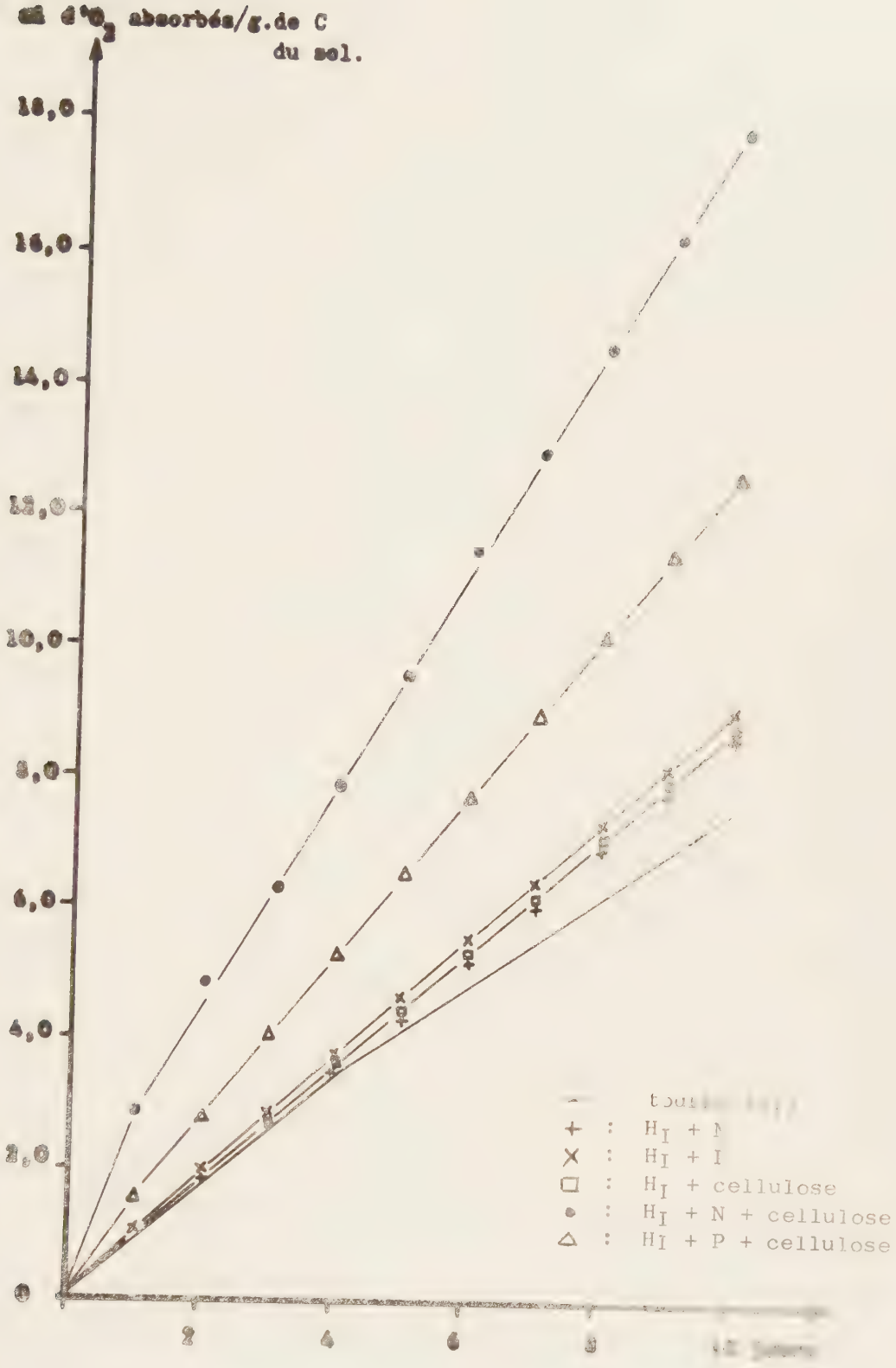


Fig. 12 - Influence des apports d'azote et de phosphate sur la dégradation de la cellulose dans la tourbe acide (H_I).
Les résultats sont rapportés en ml d'oxygène absorbés par g de carb[illegible] du sol.

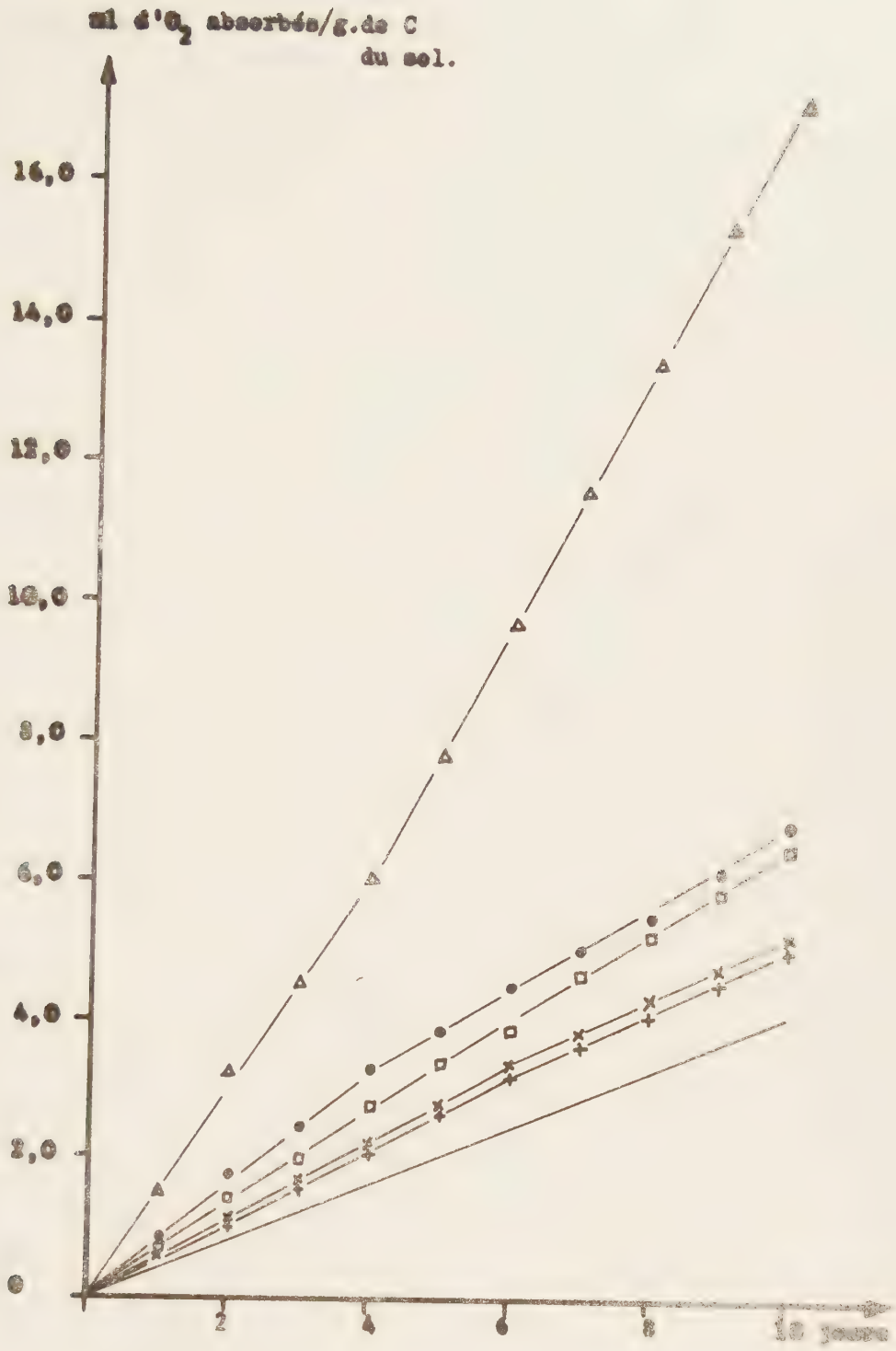


Fig. 13 - Influence des apports d'azote et de phosphate sur la dégradation de la cellulose dans la tourbe calcique (G_I).
Les résultats sont rapportés en ml d'O_2 absorbés par g de carbone de tourbe.

— : Tourbe calcique (G_I)
– : G_I + N
× : G_I + P
□ : G_I + cellulose
• : G_I + N + cellulose
△ : G_I + P + cellulose

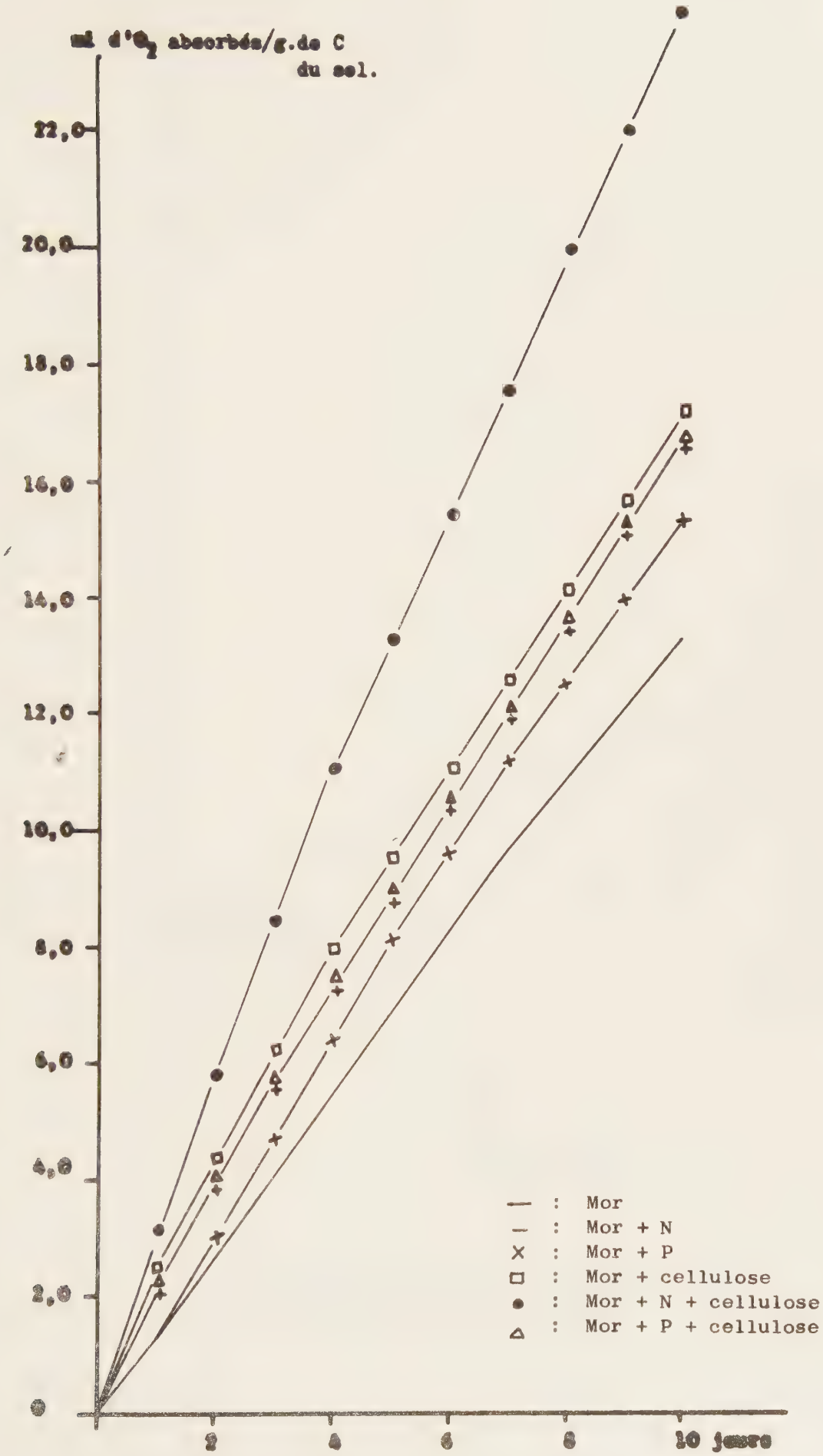


Fig. I4 - Influence des apports d'azote et de phosphate sur la dégradation de la cellulose dans le Mor
Les résultats sont rapportés en ml d'O_2 absorbés par g de carbone du sol

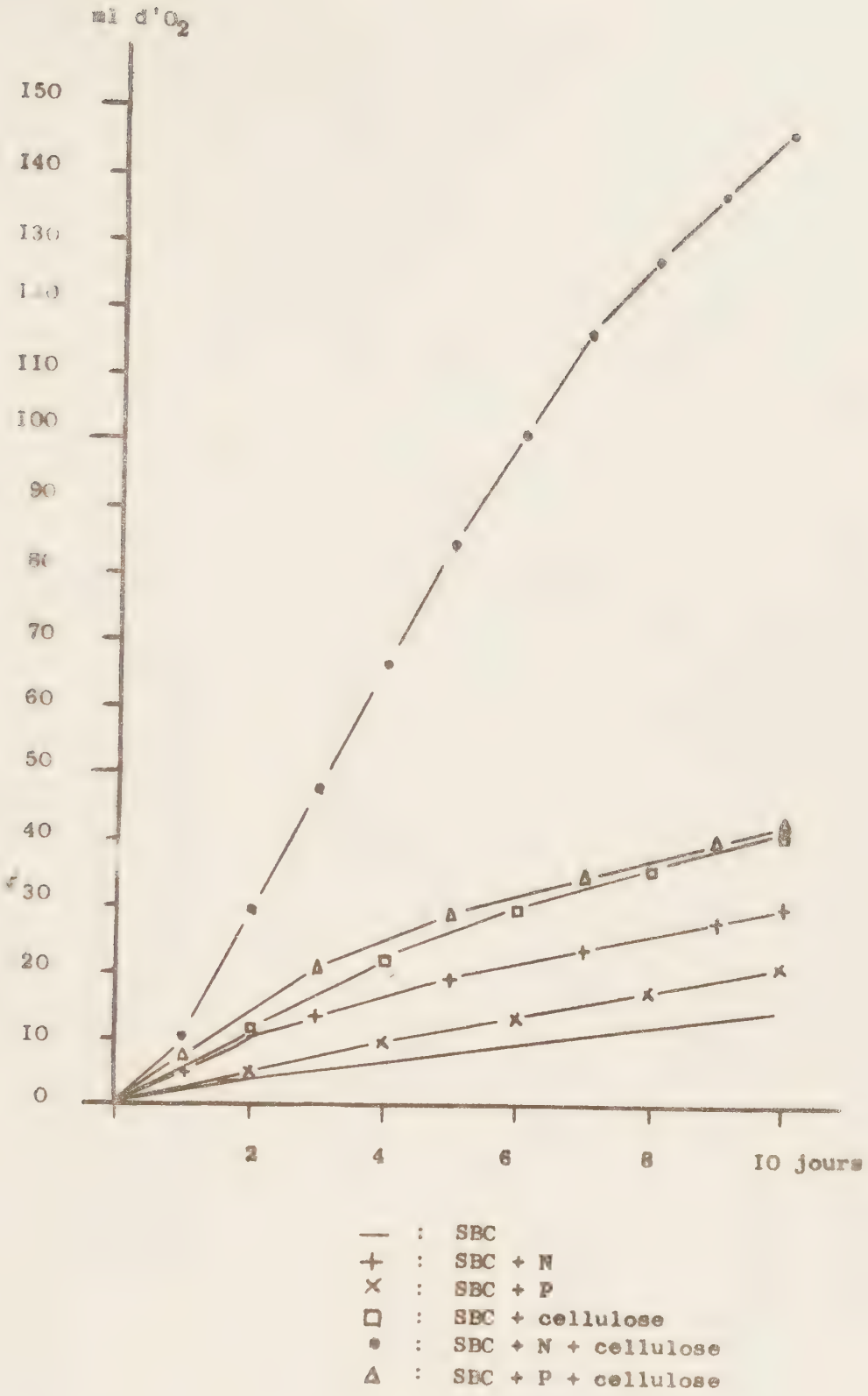


Fig. 15 - Influence des apports d'azote et de phosphate sur la dégradation de la cellulose dans le sol brun calcaire (SBC). Les résultats sont rapportés en ml d'O_2 absorbés par g de carbone du sol.

Tableau VIII - INFLUENCE DE L'ADJONCTION DE N, P, $CaCO_3$ SUR L'ACCROISSEMENT DE L'ABSORPTION D'O_2 ET SUR L'ACCROISSEMENT DU DEGAGEMENT DE CO_2 DUS A L'ENRICHISSEMENT EN CELLULOSE

	Sols organiques			Sol non organique
	Tourbe acide (H_1)	Tourbe calcique (G_1)	Mor de podzol (MR)	Sol brun calcaire (SBC)
Expérience nº 2 Accroissement de l'absorption d'O_2 : RO_2 (ml d'O_2 absorbé en IO jours par un poids de sol correspondant à I g de C organique)	sana N : I,2I avec N : 9,33 sans P : I,20 avec P : 3,78	sans P : 2,30 avec P II,72	sans N : 2,01 avec N : 4,08 sans P : 4,02 avec P : I,7I	non étudié
Expérience nº 3 Accroissement du dégagement de CO_2 : RCO_2 (mg de CO_2 dégagé en 7 jours par I g de sol sec).	sans $CaCO_3$: I,67 avec $CaCO_3$: 9,94	sans N : I,58 avec N : 4,59 sans P : I,46 avec P : 4,69	NS	sans N : 4,05 avec N : IO,90

NS : NON SIGNIFICATIF

L'expérience n° 3 confirme ces résultats et montre en outre, que N pourrait aussi jouer un rôle favorable.

- Mor de podzol

Les adjonctions de P et $CaCO_3$ sont pratiquement sans effet sur la cellulolyse dans ce type de sol organique. L'azote exerce un certain effet favorable dans le cas de l'expérience n° 2 ; l'effet de P est même dépressif, ce que l'on pourrait expliquer par une immobilisation de l'azote (fig. 14).

IV. CONCLUSION

1. Toutes nos expériences montrent indiscutablement que la cellulolyse est fortement limitée dans les différents sols organiques étudiés ; la limitation de la cellulolyse intéresse essentiellement la première étape de dégradation de la cellulose (hydrolyse de la cellulose insoluble, ici cellulose en poudre), mais peut aussi intéresser la deuxième (hydrolyse de la cellulose soluble, ici CMC Blanose R 190).

2. La limitation de la cellulolyse dans la tourbe calcique est indiscutablement due à une carence en P minéral soluble.

   La carence en P peut s'expliquer :
   - par une insolubilisation du P soluble par le calcium ;
   - par un lessivage par les eaux de pluie (GARDINER, 1966) ;
   - par une inactivation des enzymes (phosphatases) ou des microorganismes responsables de la minéralisation de P organique.

A côté de la carence en P, la tourbe calcique souffrirait aussi d'une carence en N. Cette carence en N minéral peut paraître *a priori* étonnante dans des sols qui renferment des quantités importantes d'N total (tableau I) ; mais cet azote est difficilement biodégradable en raison de processus de stabilisation par complexation (cf. DOMMERGUES et MANGENOT, 1970).

Lorsque N est minéralisé sous forme ammoniacale, il peut aussi être bloqué par réversion, réaction de N ammoniacal sur la matière organique du sol (BROADBENT et NAKASHIMA, 1967).

3. La limitation de la cellulolyse dans la tourbe acide pourrait être imputée à une carence en N minéral, et accessoirement en P minéral ; mais dans le cas de ce sol, on ne peut être aussi affirmatif que dans celui de la tourbe calcique, car les carences n'apparaissent que dans une de nos deux expériences, plus précisément dans l'expérience n° 2, dans laquelle la dose d'enrichissement en cellulose est très élevée (13,3 %). La cellulolyse est aussi limitée par l'absence de $CaCO_3$ (qui élève le pH à 6,3), donc par l'acidité.

4. La limitation de la cellulolyse dans le mor de podzol peut être partiellement attribuée à une carence en N. Elle ne peut l'être à une carence en P ou à une acidité excessive. La théorie de l'inhibition de l'activité biologique par des composés antimicrobiens (BECK et al., 1969) pourrait être invoquée pour expliquer la limitation de la cellulolyse dans ce type de sol organique.

5. Si l'on se cantonne aux sols de tourbière, on est amené à admettre que, parmi les différentes hypothèses expliquant l'origine de la limitation de la cellulolyse, il faut réserver une place importante à l'hypothèse de la déficience de ces sols en N ou P sous forme minérale soluble. Il semble, en effet, que cette déficience entraîne l'apparition d'une compétition très vive entre les microorganismes cellulolytiques et les microorganismes moins exigeants sur le plan de la nutrition azotée et phosphorée. Des expériences dont il sera rendu compte plus loin permettront de vérifier cette hypothèse.

Chapitre III - ETUDE ENZYMATIQUE

.....

I. GENERALITES

Nous avons repris l'étude de l'origine de la limitation de la cellulolyse, non plus en utilisant des méthodes respirométriques qui reflètent l'activité cellulolytique globale (cellulolyse par les micro-organismes vivants et par les enzymes du sol), mais en faisant appel à des méthodes qui reflètent l'activité cellulolytique des seuls enzymes du sol, ces méthodes étant fondées sur le dosage des différents enzymes du sol intervenant dans la dégradation de la cellulose.

On admet que la dégradation de la cellulose insoluble en glucose s'effectue en trois étapes (Reese et al., 1950) :

1ère étape : Transformation de la cellulose insoluble en cellulose soluble, sous l'effet d'une fraction enzymatique appelée C_1 par Reese (Reese et al., 1950) (qui est parfois désignée sous le terme de cellulase sensu stricto, ou plus succintement cellulase.

Son mode d'action est complexe, il comporte :

- une action sur la structure secondaire de la cellulose favorisant son contact avec l'enzyme,
- une action sur la structure primaire par rupture aléatoire des liaisons β 1,4 glucosidique , réduisant la longueur des chaines et

2ème étape : Transformation de la cellulose soluble en oligosides ou cellobiose sous l'effet d'une fraction enzymatique dite C_x (qui est parfois désignée sous le terme de CMCase). Nous utilisons comme substrat modèle de cellulose soluble la CMC (carboxyméthylcellulose).

3ème étape : Transformation du cellobiose en glucose sous l'action de la β-glucosidase ; cet enzyme agit aussi sur le trimère et le tétramère

Dans un premier stade, nous avons déterminé l'équipement enzymatique des trois sols organiques typiques étudiés antérieurement en examinant d'une part les trois fractions enzymatiques impliquées dans la cellulolyse (fraction C_1, fraction C_x, β-glucosidase), d'autre part deux enzymes intervenant dans la minéralisation de N et P organiques (uréase, phosphatase). L'étude de ces deux derniers enzymes est justifiée par le fait que, d'après les expériences antérieures (voir 2ème partie), N minéral et P minéral peuvent exercer un effet stimulant sur la cellulolyse ; il en résulte qu'une accélération de la minéralisation de N et P organiques, notamment par voie enzymatique (c'est-à-dire dans l'action d'enzymes tels que l'uréase et la phosphatase), pourrait influer favorablement sur la cellulolyse.

Dans un deuxième stade, nous avons apporté P et N à des sols préalablement enrichis en cellulose, pour vérifier si ces apports étaient susceptibles d'accroître la teneur de ces sols en fraction C_1, C_x et β-glucosidase.

II. METHODES DE DOSAGES ENZYMATIQUES

1. Mise au point d'une méthode de dosage de C_1 et C_x

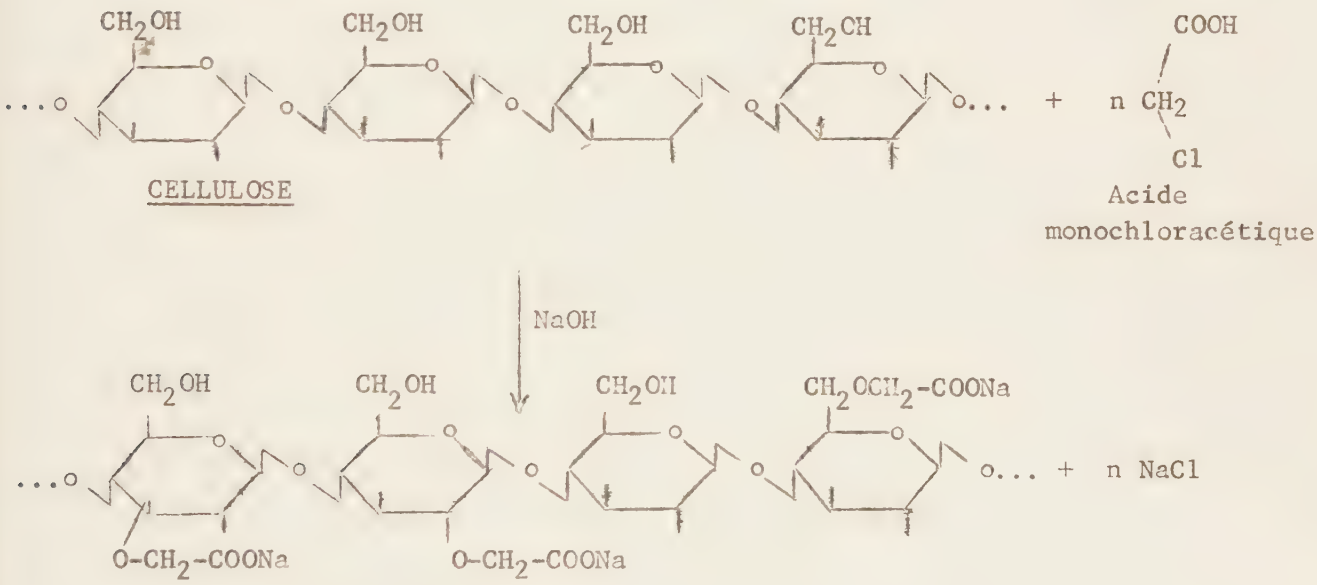
L'évaluation de l'activité des enzymes libres du sol exige le blocage de l'activité microbienne : on utilise pour cela un bactériostatique tel que le toluène ou le merthiolate. On incorpore ensuite au sol à étudier le substrat correspondant à l'enzyme dont on veut évaluer l'activité : cellulose insoluble, cellulose soluble, oligoside ; le sol est ensuite incubé dans les conditions optimales de température et de pH correspondant à cet enzyme ; il ne reste plus alors qu'à doser les produits formés pour avoir une mesure de l'activité enzymatique.

A - Substrats

La cellulose insoluble utilisée est la cellulose en poudre Durieux pour chromatographie.

Comme cellulose soluble, on utilise une carboxyméthylcellulose (CMC), obtenue par estérification partielle par l'acide monochloracétique d'une cellulose en partie hydrolysée en milieu basique : il s'agit du Blanose R 190, dont le degré de substitution est 0,64 (nombre de groupements substitués par unité de glucose) et le degré de polymérisation 90. Nous utilisons dans notre expérience la CMC pour tester le facteur C_x à cause de sa solubilité à l'eau et de son faible degré de polymérisation, ce qui n'est pas le cas d'autres produits de dégradation de la cellulose commercialisés.

La réaction de préparation de la CMC peut être schématisée comme suit :



B - Choix des conditions d'incubation

a) Effet du merthiolate :

Pour vérifier l'efficacité du merthiolate, on a mis à incuber pendant 24 h, à 28° C, la tourbe acide, maintenue à une humidité voisine de l'humidité équivalente en l'absence de merthiolate (témoin) et en présence de merthiolate, et on a effectué les numérations des microorganismes dégradant la CMC.

Les numérations ont été effectuées sur le milieu suivant :

Blanose R 190 (CMC)	10 g
NO_3NH_4	1 g
Solution de Winogradsky (suivant Pochon & Tardieux, 1962)	30 ml
Extrait de terre	30 ml
CO_3Ca précipité (Merk)	3 g
Eau distillée qsp.	1000 ml

Le milieu a été réparti en tubes de 12 x 120 mm, à raison de 2 ml par tube et stérilisé deux fois à 120° C à 24 heures d'intervalle et ensemencé avec des suspensions dilution de sol. L'incubation conduite à 28° C a duré 7 jours. On a considéré comme positifs les tubes où le milieu qui était à l'origine visqueux et laiteux (en raison du maintien en suspension du $CaCO_3$) était devenu parfaitement fluide et limpide.

Dans les témoins, la densité de ces microorganismes s'est maintenue aux environs de 10^5 par g de sol sec à l'air, tandis que dans les sols traités au merthiolate, cette densité est tombée à 10^3. Le merthiolate n'est donc pas seulement bactériostatique ; il présente aussi une activité bactéricide certaine. Bien que cette action bactéricide puisse être à l'origine d'un accroissement de la teneur des sols en enzymes, on a adopté cet antiseptique, la dose préconisée étant de 0,01 % dans la suspension du tampon-substrat.

b) Choix du pH :

On a comparé les 4 pH différents (4,5 ; 5,5 ; 6,5 et 7,5) obtenus à l'aide de solutions-tampon au phosphate.

Les figures 16 et 17 expriment graphiquement les résultats obtenus respectivement avec la cellulose et la CMC.

Dans le sol brun calcaire (SBC) on n'a observé aucune activité des facteurs C_1 et C_x quel que soit le pH.

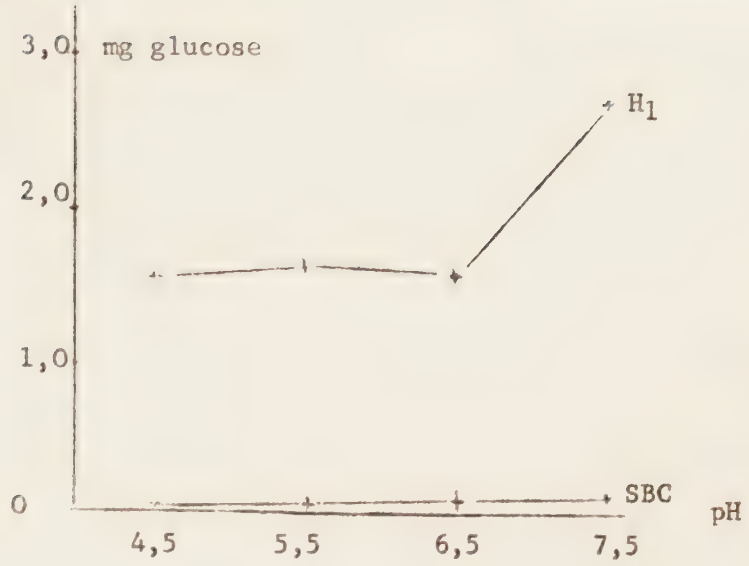


Fig. 16 - Influence du pH sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (après incubation 5 j à 37° C).
Sucres réducteurs formés, exprimés en mg glucose/g du sol sec.

H_1 : Tourbe acide du Hohneck
SBC : Sol brun calcaire du Montet.

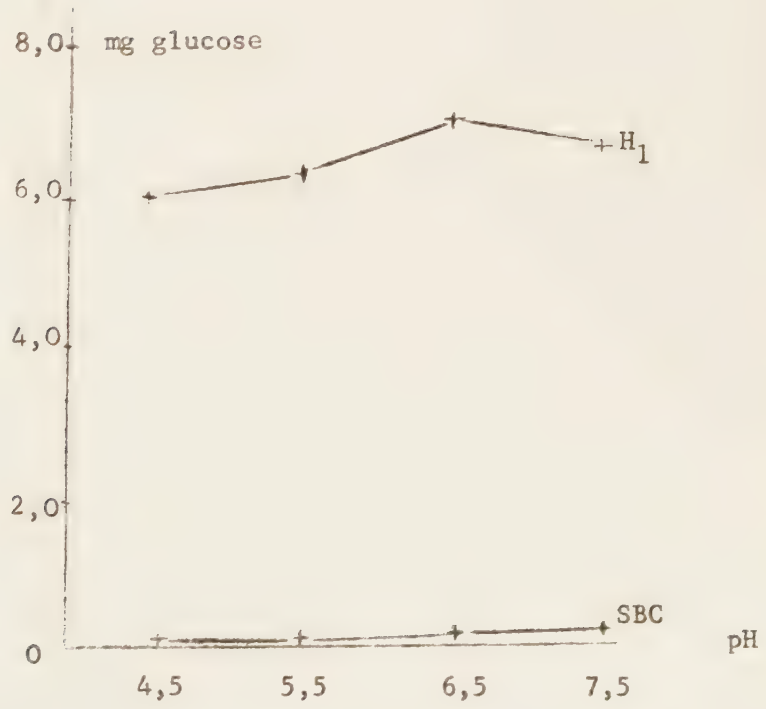


Fig. 17 - Influence du pH sur l'hydrolyse enzymatique de la CMC (après incubation 22 h à 37° C.)
Sucres réducteurs formés exprimés en mg glucose/g du sol sec.

H_1 : tourbe acide du Hohneck
SBC : sol brun calcaire du Montet.

Dans la tourbe acide (H_1) au contraire, cette activité s'est clairement manifestée ; en outre, on a pu constater que, dans ce sol, l'élévation du pH s'avère favorable ; toutefois, nous n'avons pas adopté la solution-tampon à pH élevé pour deux raisons : (1) le pH élevé est trop éloigné du pH des tourbes acides qui est de l'ordre de 3,5 (2) en milieu alcalin ou neutre, la matière organique se solubilise, colorant les solutions d'extraction, rendant la filtration difficile et diminuant la précision des mesures ultérieures. En définitive, nous nous sommes ralliés à une solution intermédiaire consistant à utiliser un tampon 5,5.

c) Choix des concentrations en substrat et du temps de réaction :

Des concentrations différentes furent essayées : 0,4 ; 0,8 ; 1,6 et 2 % dans la suspension. Pour la cellulose, trois temps de réaction (temps d'incubation) furent comparés (1; 5, 10 jours) et quatre pour la CMC (3, 6, 14, 24 heures). Les résultats sont regroupés dans les figures 18 et 19 ainsi que dans les tableaux IX et X.

Pour ce qui est des échantillons additionnés de cellulose, le rendement de l'hydrolyse augmente fortement du 1er au 5ème jour, mais n'est pas augmenté notablement par la suite (tableau IX). Cette durée de 5 jours fut donc retenue pour l'incubation. Quant à la dose de cellulose à apporter, la plus petite (0,4 % du poids frais) donne le meilleur rendement ; mais la faiblesse des doses de glucose à mesurer lui a fait préférer la dose de 0,8 %.

En ce qui concerne les échantillons additionnés de CMC, on a retenu une durée d'incubation de 22 heures ; par ailleurs, la dose de 0,4 % de CMC a été adoptée ici, car le rendement de l'hydrolyse (pourcentage de CMC hydrolysée) est élevé et la quantité de glucose formé facilement mesurable.

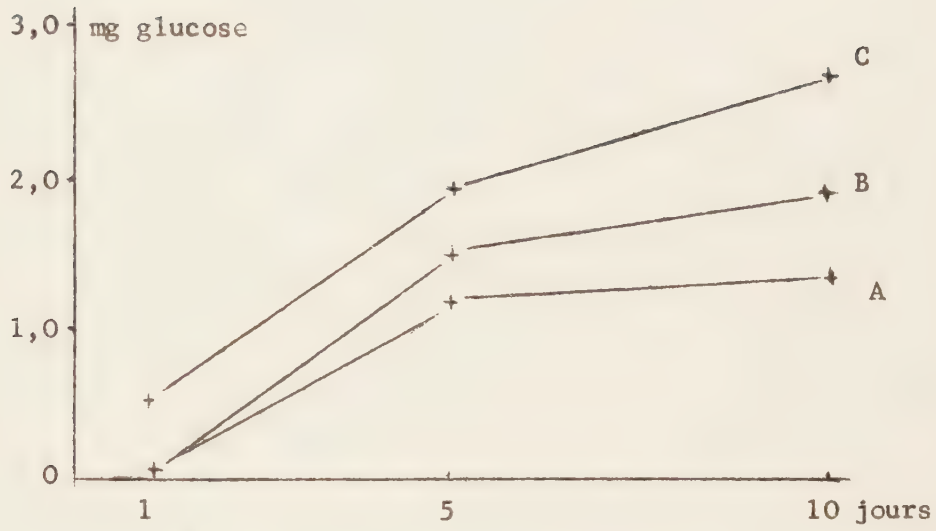


Fig. 18 - Influence de l'apport de la cellulose et du temps d'incubation sur la quantité des sucres réducteurs formés, exprimés en mg glucose/g de sol sec. (tourbe acide du Hohneck).

A : 0,4 % de cellulose

B : 0,8 % de cellulose

C : 2,0 % de cellulose.

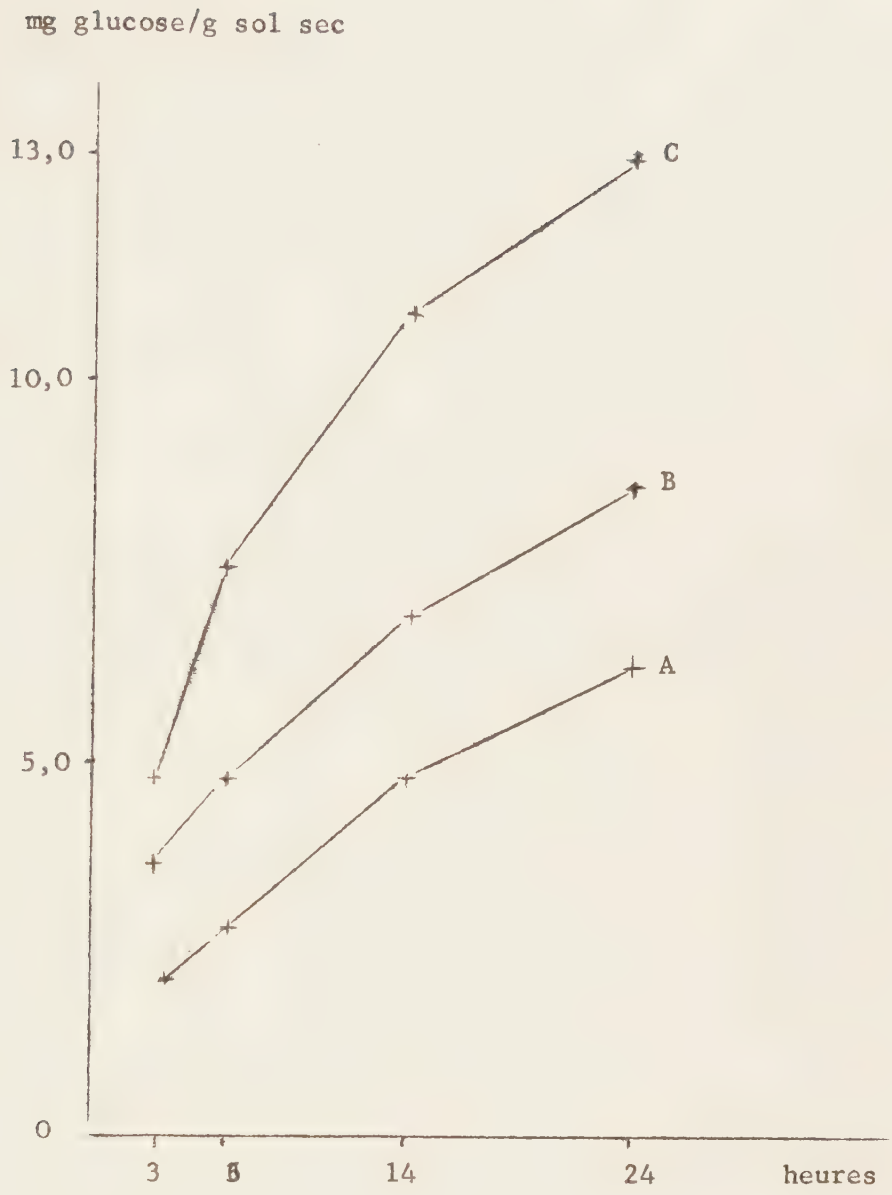


Fig. 19 - Influence de l'apport de la CMC et du temps d'incubation sur la quantité des sucres réducteurs formés, exprimés en mg glucose/g du sol sec.(tourbe acide du Hohne

A : 0,4 % de CMC

B : 0,8 % de CMC

C : 1,6 % de CMC

	Temps de réaction (jours)		
Concentration de la cellulose	Ier jour	5ème jour	IOème jour
0,4 %	0	2,25	2,62
0,8 %	0	I,40	I,80
2,0 %	0,I8	0,73	I,00

Tableau IX : Influence de concentration de la cellulose et du temps de réaction sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose exprimé par le pourcentage de cellulose hydrolysée en sucres réducteurs après une durée de réaction à 37° C.

	Temps de réaction (heures)			
Concentration de la CMC	3 h	6 h	I4 h	24 h
0,4 %	3,75	5,25	9,00	II,88
0,8 %	3,37	4,38	6,44	8,I2
I,6 %	2,I9	3,56	5,I2	6,06

Tableau X : Influence de la concentration et du temps de réaction sur le rendement de l'hydrolyse de la CMC, exprimé par le pourcentage de CMC hydrolysé en sucre réducteur après une durée de réaction à 37° C.

- On compare le résultat à la courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec des solutions de glucose ayant des concentrations de 0, 10, 30, 50 µg. Le taux de glucose dans la prise d'essai ne doit pas passer 50 µg, pour suivre la loi de Beer-Lambert.

En ajoutant 2,7 g d'acide benzoïque, la solution étalonnée de glucose peut se conserver très longtemps à la température de laboratoire. L'acide benzoïque n'interfère pas dans la détermination du glucose par l'enzyme.

(4) Résultats

Les méthodes, ci-dessous exposées, de dosages de glucose, des hydrates de carbone et des sucres réducteurs ont été appliquées à l'étude de l'accumulation en fonction du temps des produits de dégradation de la cellulose en poudre et de la CMC dans la tourbe acide du Hohneck. Les résultats regroupés dans les fig. 22 et 23 montrent un certain parallélisme entre les courbes du glucose, les hydrates de carbone, et les sucres réducteurs s'accumulant au cours de l'incubation. Nous basant sur cette corrélation, nous avons admis que la teneur des sucres réducteurs pouvait constituer un indice valable de l'activité des fractions C_1 et C_x.

D. Protocole retenu pour le dosage de C_1 et C_x

L'étude de l'influence du bactériostatique, du pH, des doses de substrat, de la durée d'incubation, ainsi que des considérations écologiques (pH) ou analytiques (doses minimales de sucres dosables avec précision) nous ont permis de mettre au point une méthode d'évaluation des activités C_1 et C_x qui donne toute satisfaction dans le cas de sols très organiques. (1)

---

(1) Par contre, dans le cas d'un sol non-organique (sol brun calcaire) aucune activité des cellulases libres n'a pu être mise ainsi en évidence. Il ne semble pas qu'il faille incriminer le tampon dans lequel se fait la réaction, car un changement de pH ne modifie pas la chose, mais bien plutôt une adsorption ou une complexation des enzymes comme l'a signalé Reese en 1968.

C - Etude qualitative et quantitative des produits de la réaction

a) Etude qualitative des sucres réducteurs formés (Charpentier, 1965)

On sait que les produits de la cellulolyse sont constitués d'hydrates de carbone qui comprennent des sucres réducteurs (glucose, cellotriose) et des sucres solubles non réducteurs. Nous avons cherché ici à vérffier la composition des sucres réducteurs formés dans les filtrats obtenus après action enzymatique ; le filtrat (20 ml) était d'abord purifié par passage sur résines anioniques (Dowex 1, Fluka) et cathioniques (Amberlite IR-120, Merck), puis évaporé à sec, à 40° C, sous vide partiel ; le résidu, dissous dans 1 ml d'eau était alors soumis à une chromatographie descendante sur papier Whatman I avec les solvants suivants :

SOLVANTS :

n° 1 : Butanol - pyridine - eau : 6 - 4 - 3

n° 2 : Propanol - acétate d'éthyle - eau : 7 - 1 - 2

Le solvant n° 1 permet une bonne séparation des oligosides de poids moléculaire faible (biholosides) ; le solvant n° 2, au contraire, sépare bien les oligosides de poids moléculaire élevé (triholoside et tetraholoside).

REVELATEURS :

n° 1 : Révélateur dinitrosalicylique de Jeanes (1951) :

Acide dinitrosalicylique	0,5 g
Soude en pastilles	4,0 g
H_2O distillée	100 ml

Chauffage de 4 à 5 minutes à 100° C.

n° 2 : Révélateur de Schwimmer et Bevenue (1956) :

Aniline	4,0 g
Diphénylamine (dissoudre dans 200 ml d'acétone)	4,0 g
Acide o-phosphorique à 80 %	20 ml

Chauffage de 4 à 5 minutes à 80° C.

Ces deux révélateurs permettent de mettre en évidence que :

a) les sucres réducteurs donnent une coloration brune avec le révélateur de Jeanes ;

b) le révélateur de Schwimmer permet de distinguer les liaisons entre les molécules des aldo-hexoses ; la liaison 1 - 4 se colorant en bleu, la liaison 1 - 3 en beige la liaison 1 - 6 en gris-bleu, la liaison 1 - 2 en jaune, le glucose étant coloré en bleu-vert.

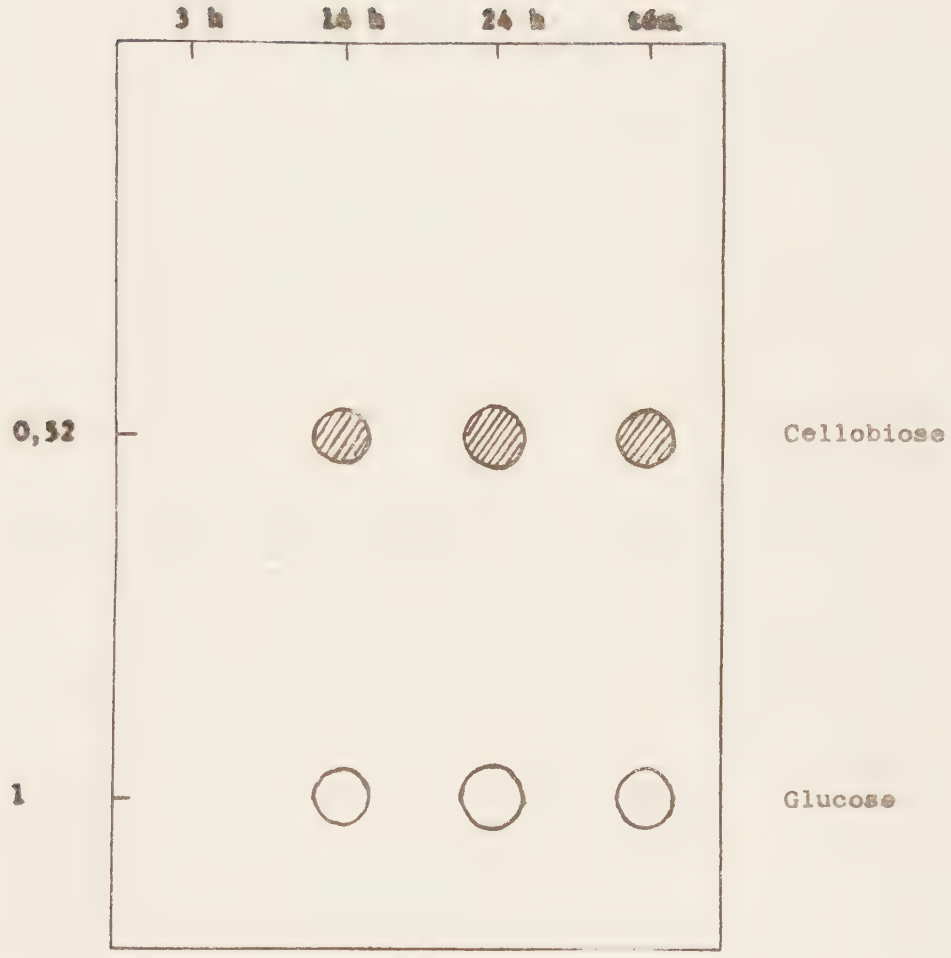


Fig. 2I - Chromatogramme. Formation de sucres reducteurs en fonction du temps (incubation à 37° C pendant 3 h et 24 h).
Substrat : CMC (Blanose R I90)
Solvant : propanol - acétate d'éthyle - eau. 7 : I 2

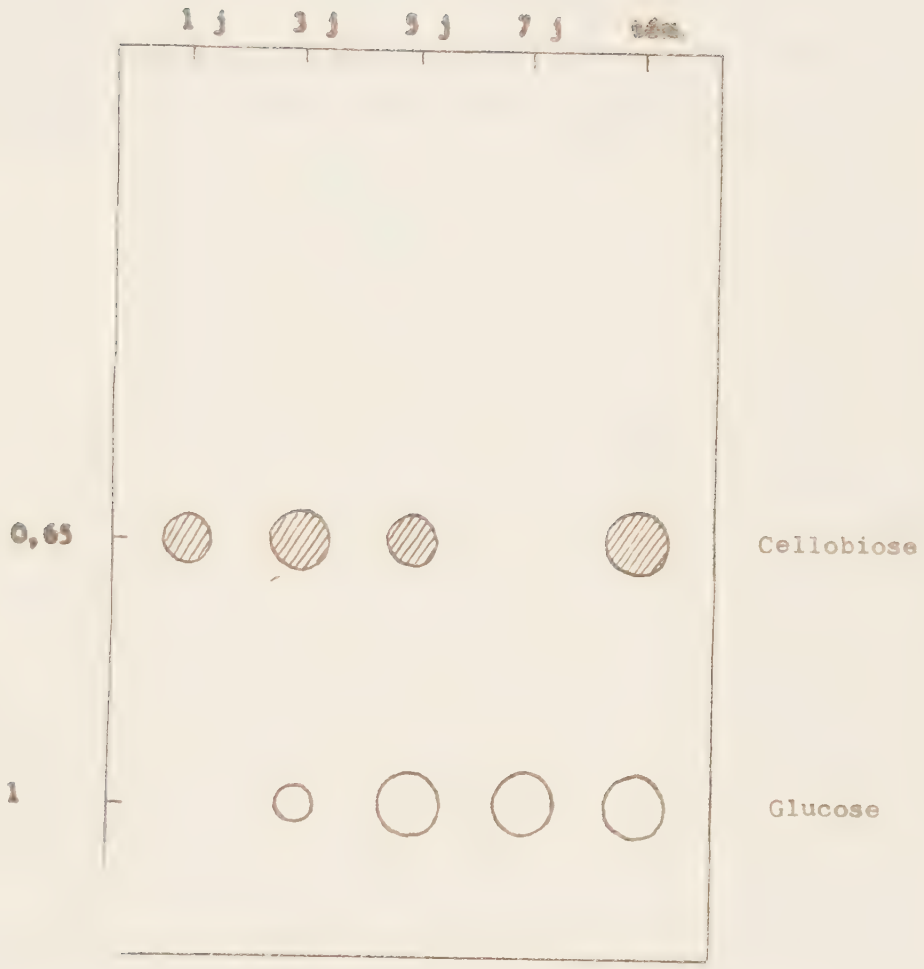


Fig. 20 - Chromatogramme. Formation de sucres réducteurs en fonction du temps (incubation à 37° C pendant un jour et 7 jours).
Substrat : cellulose en poudre (Durieux)
Solvant : butanol - pyridine - eau, 6 : 4 : 3.

RESULTATS OBTENUS APRES ETUDE QUALITATIVE :

L'étude des chromatogrammes (fig. 20 et 21) montre qu'il ne se forme que du glucose et du cellobiose, à l'exclusion de tout oligoside de poids moléculaire plus élevé ou possédant une liaison osidique autre que la liaison β 1 - 4.

b. Etude quantitative

(1) Dosage des hydrates de carbone solubles dans le filtrat de culture ou l'extrait enzymatique du sol.

Réactif :

Dissoudre 200 mg d'orcinol (toluène 35 dihydroxyde) dans 100 ml de H_2SO_4 à 70 %.

Dosage des hydrates de carbone selon Miller (1960)

- prélever 0,2 ml de filtrat ou d'extrait du sol dans un tube à essai (n° 12) ; ajouter 0,3 ml d'eau distillée, puis 3 ml de réactif à l'orcinol ; plonger les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 20 minutes ; laisser refroidir les tubes à la température du laboratoire.

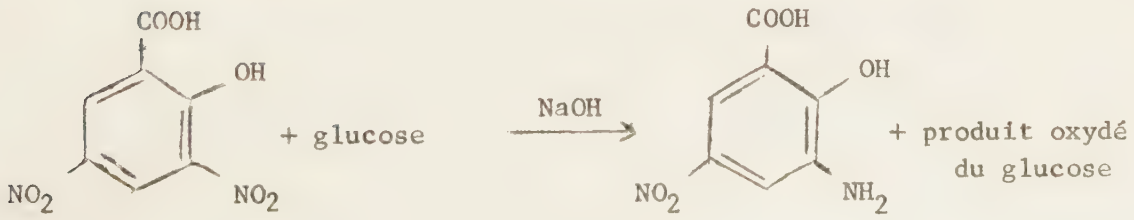
- faire la lecture au spectrophotomètre (λ = 550 mμ). Pour la courbe d'étalonnage, préparer une série de 0 ; 0,05 ; 0,10 et 0,15 mg de glucose dans 0,5 ml d'eau distillée.

Il faut néanmoins éviter d'introduire des poussières dans les tubes d'expérience ou de réactif pour obtenir un bon résultat.

(2) Dosage des sucres réducteurs

La méthode utilisée est celle de Sumner et Somers (1944) qui consiste à doser par colorimétrie l'acide 3 amino 5 nitro salicylique obtenu en présence de sucre réducteur par réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique

La réaction de l'acide dinitrosalicylique est la suivante :



Acide 3,5 dinitro-salicylique (jaune)

Acide 3 amino 5 nitro-salicylique (brun foncé)

Les monosaccharides (ex. : glucose) ou oligosaccharides possèdent un groupement aldehyde qui peut réduire certains métaux, et l'acide dinitrosalicylique. Le sucre lui-même subit une isomérisation, ou une oxydation, mais le produit final ne peut pas être identifié (Daniel, 1967).

Préparation du réactif dinitrosalicylique :

a) Acide dinitrosalicylique (Merck) à 1 %	880	ml
Soude à 4,5 %	300	ml
Tatrate de potassium et de sodium	225	g
b) Phénol	10	g
Soude à 10 %	22	ml
Bisulfite de sodium	10	g
Eau distillée q.s.p.	100	ml

Mélanger 69 ml de la solution b avec la solution a ; le réactif est prêt à l'emploi ; il est très stable.

Réaction :

- Dans un tube de Folin-Wu, mettre :
  1 ml du filtrat à analyser ou 1 ml de solution étalon
  3 ml du réactif dinitrosalicylique.

- Bien agiter les tubes pour homogénéiser, les plonger pendant 5 minutes dans un bain-marie bouillant puis les tremper dans l'eau glacée pendant une minute.

- Ajouter de l'eau distillée jusqu'au trait de 25 ml, retourner les tubes 5 fois.

- Après 15 minutes, passer au spectrophotomètre à 540 µ.

- La droite d'étalonnage est obtenue avec une gamme de doses de glucose de 0,2 à 0,8 mg pour le ml de prise d'essai.

Cette méthode permet le dosage de sucres réducteurs en présence de polysaccharides non réducteurs.

(3) "Dosage" du glucose par la méthode de la glucose-oxydase

Le glucose est dosé au spectrophotomètre en présence du réactif à la glucose-oxydase préparé selon Hugget et Nixon (1957).

Principe de la méthode :

Le glucose est oxydé spécifiquement par la glucose-oxydase en acide gluconique, avec libération d'H_2O_2, dont la réduction par la peroxydase est mise en évidence par le brunissement du chromogène (O-dianisidine). La couleur est lue au spectrophotomètre à 420 mμ.

La réaction est la suivante :

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{glucose}} \text{acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \underset{\text{(incolore)}}{\text{chromogène réducteur}} \xrightarrow{\text{peroxydase}} \underset{\text{(brun)}}{\text{chromogène oxydé}} + H_2O$$

Réactif :

- Mettre 125 mg de glucose-oxydase (1200 E/g. Merck) dans une fiole jaugée de 100 ml : ajouter 0,5 mg de peroxydase (de Fluka AG) dissoute dans 0,5 ml d'une solution éthanol à 1 % d'orthodianisidine, compléter à 100 avec du tampon phosphaté disodique 0,5 M, pH 7,0. Après la filtration, on conserve cette solution au frigidaire (4° C).

- Préparation de tampon phosphaté disodique :
  54,2 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ et 23,4 g de NaH_2PO_4 dissoudre dans 1 000 ml d'eau distillée.

Dosage du glucose :

- A 0,5 ml de prise d'essai contenue dans un tube de 10 ml, ajouter 3 ml de réactif glucose oxydase-peroxydase (GOP) ; après agitation et incubation de 60 minutes à la température de 37° C, il se développe une teinte brune, dont l'absorption lumineuse est évaluée au spectrophotomètre à 420 mμ.

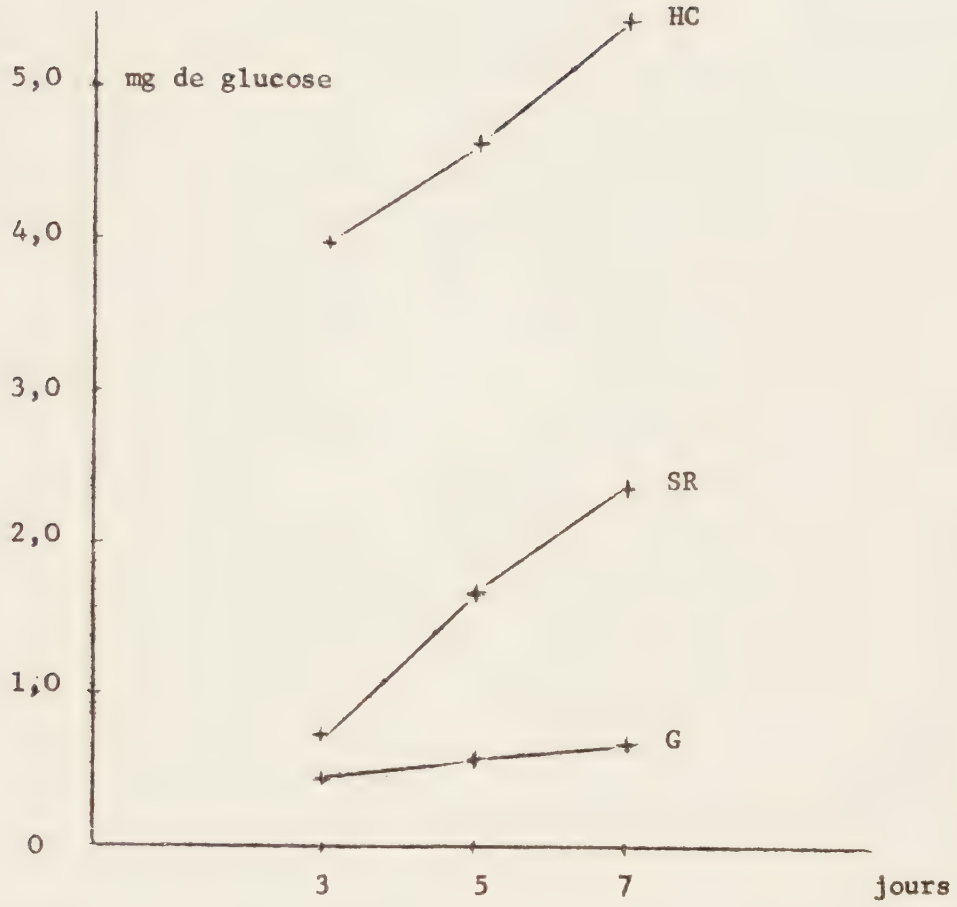


Fig. 22 : Activité enzymatique de la tourbe acide du Hohneck (H_1 sur la cellulose (0,8 %). Formation d'hydrates de carbone, de sucres réducteurs et de glucose en fonction du temps.

Activité enzymatique : mg glucose/g sol sec.

HC : concentration des hydrates de carbone
SR : concentration des sucres réducteurs
G : concentration du glucose (glucose-oxydase).

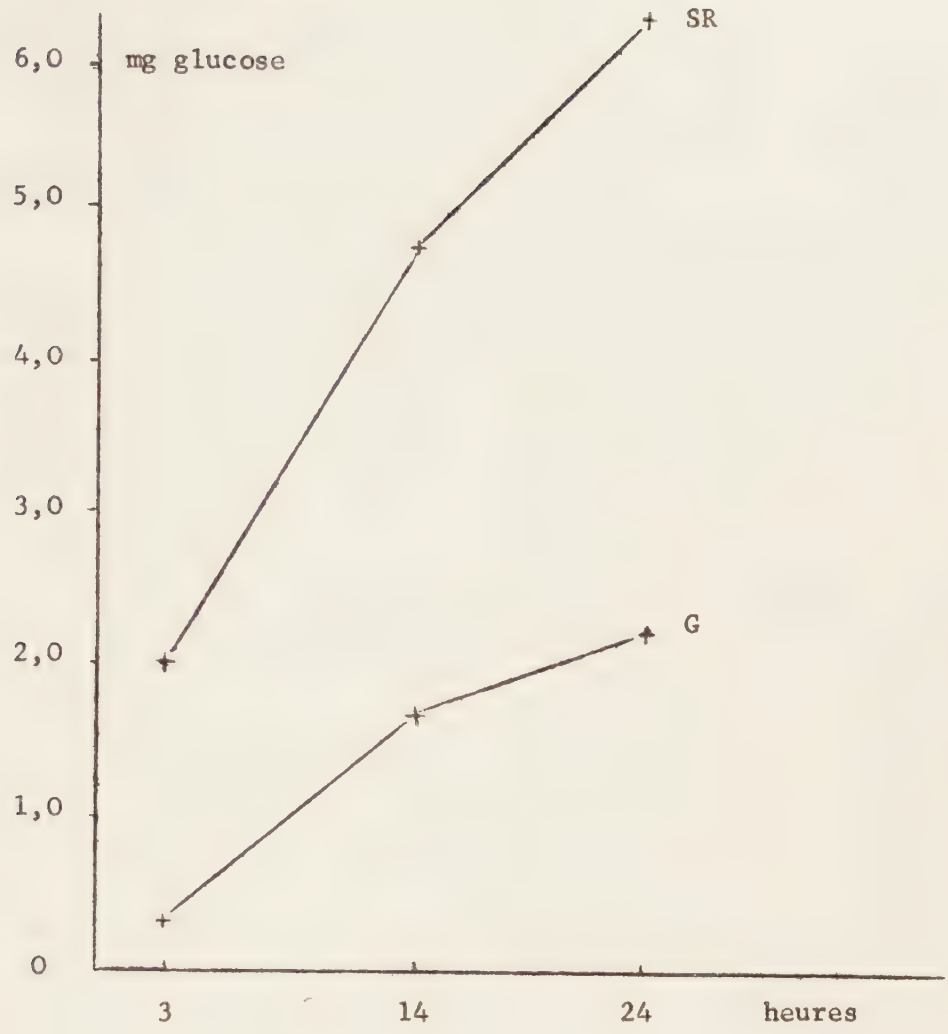


Fig. 23 : Activité enzymatique de la tourbe acide du Hohneck (H_1) sur la CMC (0,4 %). Formation de sucres réducteurs et du glucose en fonction du temps.

Activité enzymatique : mg glucose/g sol sec.

SR : concentration des sucres réducteurs
G : concentration du glucose (glucose oxydase)

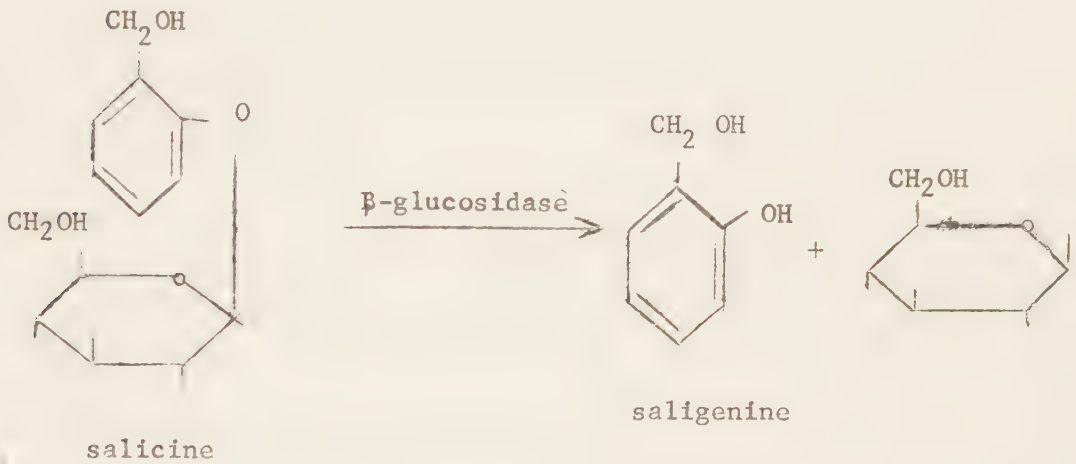
Remarque : Etant donné que la CMC est un hydrate de carbone soluble, il n'a pas été possible de différencier cet hydrate de carbone des hydrates de carbone résultant de la dégradation de la CMC.

2. Dosage des autres enzymes étudiés

A - Dosage de la β-glucosidase (Hoffmann G., Dedeken M., 1965)

a) Substrat

Le substrat utilisé est ici un arylglucoside, la salicine, que l'hydrolyse enzymatique scinde en deux moitiés une mole de glucose et une mole de saligenine.



On utilise une solution de salicine à 115,32 g/l,(dont 1 ml peut donner 50 mg de saligenine).

Selon Reese et Levinson (1952), il est intéressant de noter que la β-glucosidase provenant de microorganismes cellulolytiques réagit plus activement sur la salicine que sur le cellobiose ; la β-glucosidase provenant au contraire de microorganismes non-cellulolytiques poussant sur l'amidon attaque souvent plus activement le cellobiose que la salicine. En conséquence, pour tester l'activité de la β-glucosidase, nous utiliserons la salicine comme substrat.

b) Dosage de la saligenine formée

En présence de 2,6-dibromoquinone chlorimine, le produit phénolique (saligenine) donne du bleu d'indophénol en milieu alcalin de pH = 9,6 (tampon borate). Le tampon s'obtient en dissolvant 56,85 g de borax (soit 30 g de tétraborate de sodium anhydre) dans 1,5 l d'eau tiède après quoi on ajuste le pH à 9,6 avec de la soude à 20 % avant de compléter à 2 l.

La 2,6 - dibromoquinone chlorimine utilisée est en solution à 2 ‰ dans l'alcool.

Dans une fiole jaugée de 50 ml, mettre :

- 3 ml du filtrat à analyser
- 2 ml du tampon borate
- 0,5 ml de solution de dibromoquinone.

Bien agiter pour homogénéiser; laisser reposer une heure et passer au spectrophotomètre à 578 mμ ; avec une cuvette de 2 cm, la concentration de saligenine ne doit pas dépasser 150 μg pour suivre la loi de Beer Lambert ; si la concentration en saligenine est trop importante, diluer avec du tampon acétate.

La courbe d'étalonage se fait avec une gamme de solutions de phénol à 0 ; 2,56 ; 12,80 ; 25,60 et 38,40 mg/l correspondant respectivement à 0 ; 10 ; 50 ; 100 ; et 150 μg de saligenine pour les 3 ml utilisés dans la réaction.

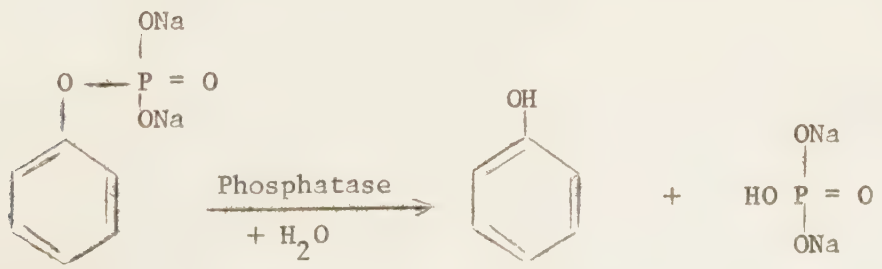
B - Dosage de la phosphatase

Dans les différents sols tourbeux, on observe toujours que le blocage de l'activité de la cellulolyse provient de la carence en phosphate assimilable ou en azote minéral . Cela nous aménera à évaluer la teneur des sols (1) en phosphatase (enzyme libérant le phosphate à partir d'un composant phosphate organique) (2) en uréase (enzyme libérant l'ammoniaque à partir de l'urée).

Nous présenterons dans ce paragraphe la technique de dosage de la phosphatase (Hoffmann, 1967) et dans le suivant celle du dosage de l'uréase.

a) Principe de la méthode

La phosphatase hydrolyse un dérivé phosphoré organique - ici phénylphosphate de Na - suivant la réaction :



On dose le phénol formé par spectrophotométrie.

b) Réactifs

1. Solution de substrat : dissoudre 6,75 g de disodium-phényl-phosphate dans un litre d'eau distillée, donc 1 ml de cette solution contient 25 mg de phénol.

2. Tampon acétate :

a- diluer 60 ml d'acide acétique dans un litre d'eau distillée ;

b- dissoudre 136 g de sodium acétate dans un litre d'eau.

Mélanger les solutions a et b à une proportion de ½, ajuster cette solution à pH 5,0.

3. Tampon borate (pH 9,6) :

Dissoudre 56,85 g de Borax (ou 30 g de Borax anhydre) dans 1,5 l d'eau tiède ; amener à pH 9,6 avec NaOH (20 %), puis compléter à 2 litres.

4. Réactif colorant :

Dissoudre 200 mg de dibromo-2,6 chloroimine dans 100 ml d'alcool éthylique.

5. Solution standard de phénol :

a- dissoudre 1 g de phénol dans un litre d'eau ;

b- prélever 10 ml de la solution a, et diluer un litre ainsi un ml de cette solution contient 10 µg de phénol.

c) Manipulations préparatoires

- introduire 10 g d'échantillons du sol dans un flacon sérum de 250 ml.

  Ajouter 1,5 ml de toluène, bien mélanger. Attendre 15 minutes.

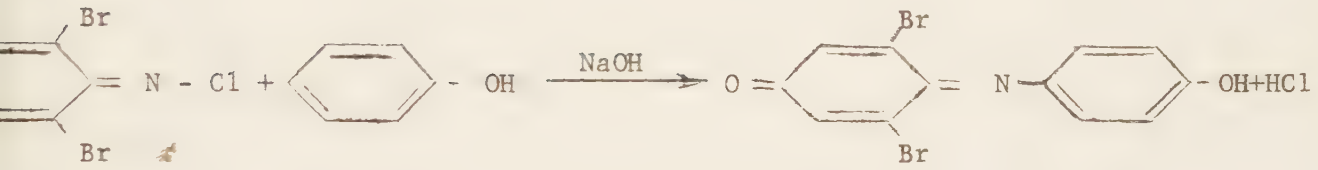
- ajouter 10 ml de substrat, et 20 ml de tampon acétate, agiter pour homogénéiser ; puis incuber pendant 3 heures à 37°.

- après l'incubation, verser 70 ml de l'eau distillée pour chaque flacon de sérum et filtrer.
  Prélever 1 ml de ce filtrat pour déterminer l'activité phosphatasique.

d) Dosage du phénol

Le phénol à pH 9,6 mis en présence de dibromo-2,6 quinone chloroimine donne une formation de dibromo-2,6 indophénol qui possède une coloration bleue (λ max. = 600 mμ).

La réaction est la suivante :



romo - 2,6 quinone chlorimine

Dibromo - 2,6 indophénol (bleu)

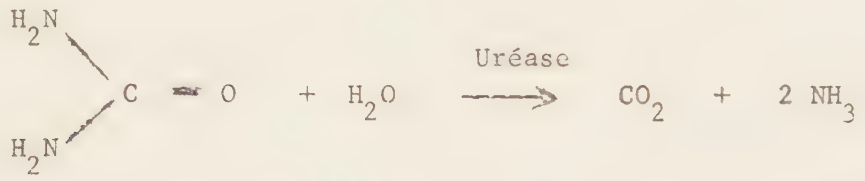
- Prélever 1 ml de filtrat et l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml ;
  Ajouter 5 ml de tampon borate, 25 ml d'eau distillée, 1 ml de réactif colorant, bien mélanger, laisser reposer pendant 30 minutes.
- Après 30 minutes, ajuster chaque fiole à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Faire la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 600 mμ.
- Faire parallèlement une gamme étalon avec des concentrations en phénols de 50 μg à 150 μg avec la solution étalonnée (5) de l'ordre de 0,5, 10, 15 ml.

Les résultats exprimés en mg de phénol libéré correspondent à 100 mg de C du sol/3 h.

C - Dosage de l'uréase (Hoffmann et Teicher, 1961)

a - Principe de la méthode :

L'uréase hydrolyse l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une mole de CO_2



On dose l'azote ammoniacal formé par spectrophotométrie.

b - Réactifs :

1) Toluène

2) Tampon citrate (pH 6,7)

a. dissoudre 368 g d'acide citrique dans 800 ml d'eau

b. dissoudre 295 g de potassium hydroxyde (KOH) dans 600 ml d'eau distillée.

Mélanger a et b ; ajuster le pH 6,7. Compléter à 2 litres avec l'eau distillée.

3) Solution de substrat (10 %) ; dissoudre 100 g d'urée dans un litre d'eau.

4) Solution phénolique : dissoudre 62,4 g de phénol dans un mélange d'alcool et d'acétone (2 ml de méthanol, 18,5 ml d'acétone, et d'alcool éthylique), compléter à 100 ml.

5) Solution de soude (27 %) : dissoudre 27 g de NaOH dans 100 ml d'eau.

6) Solution alcaline de Phénol
Mélanger 20 ml de la solution 4 et 20 ml de la solution 5 dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter à 100 ml avec de l'eau.

7) Solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) ; préparer une solution à 0,9 % de degré de chlore activé.

8) Solution étalonnée :

a. dissoudre 4,717 g de $(NH_4)_2 SO_4$ dans un litre d'eau distillée ;

b. prélever 10 ml de la solution a, et diluer à 1000 ml ; donc un ml contient 10 µg d'azote sous forme ammoniaque.

c - Manipulations préparatoires

- Introduire 10 g d'échantillons du sol dans un flacon sérum de 250 ml

  Ajouter 1 ml de toluène ; bien mélanger, attendre 15 mn.

- Ajouter 10 ml du substrat et 20 ml de tampon acétate, agiter pour homogénéiser ; puis incuber pendant 3 heures à 37°.

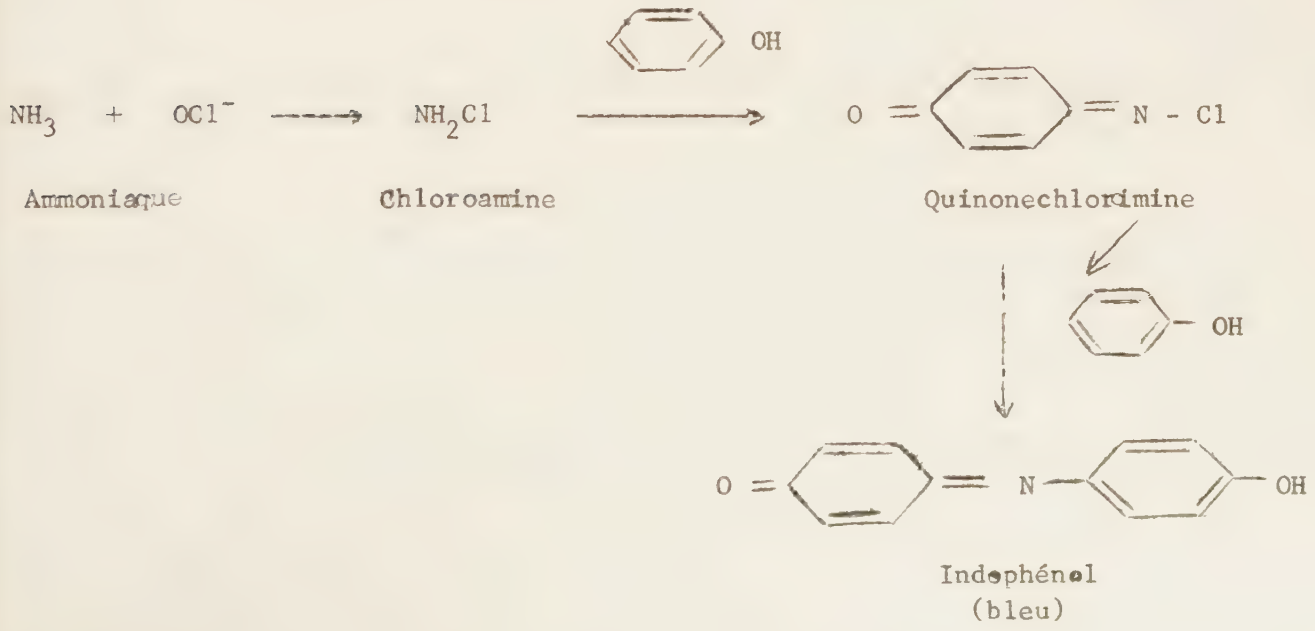
  Après incubation, verser 70 ml de l'eau distillée pour chaque flacon de sérum et filtrer.

- Après la filtration, prélever 1 ml de ce filtrat pour déterminer l'activité uréasique.

d - Dosage d'ammoniaque

L'ammoniac mis en présence avec du phénolate de sodium et de l'hypochlorite donne une formation d'indophénol bleu, pouvant être estimé au spectrophotomètre.

La réaction est la suivante (Bolleter et al., 1961)



III. DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LA TENEUR DES SOLS EN ENZYMES

Le plus rapidement possible, après le prélèvement, chacun des trois sols a été soumis aux traitements suivants :

(I) aucun enrichissement (témoin)
(2) enrichissement en $(NH_4)_2SO_4$
(3) enrichissement en K_2HPO_4
(4) enrichissement en cellulose (I)
(5) enrichissement en cellulose et $(NH_4)_2SO_4$
(6) enrichissement en cellulose et K_2HPO_4

Les enrichissements en cellulose ont été effectués à la dose de 2 %, dose exprimée en fonction du sol humide. Si l'on s'exprime en fonction du poids de sol sec à l'air, les doses sont respectivement de I3,3 %, I0,0 %, 7,4 % pour H_I, G_I et MR. Les enrichissements en N (du sulfate d'ammonium) et en P (du phosphate dipotassique) ont été I00 fois plus faibles, c'est-à-dire 0,I3 % , 0,I0 %, 0,07 % pour H_I, G_I et MR (doses exprimées en fonction du poids de sol sec à l'air.

Pendant l'incubation, qui a duré I0 jours à une température constante de 28° ± I° C, l'humidité des sols s'est maintenue au niveau de l'humidité au moment des prélèvements, soit 596 % pour la tourbe acide (H_I), 400 % pour la tourbe calcique (G_I) et 270 % pour le mor (MR), ces humidités correspondant sensiblement à la capacité au champ. L'incubation a eu lieu dans des flacons sérum de 500 ml, à raison de 60 à 80 g de sol frais par flacon. Ces flacons constituant les chambres de respiration d'un respiromètre électrolytique, le renouvellement d'oxygène s'est effectué automatiquement.

A la fin de l'incubation, les enzymes du sol ont été dosés suivant les méthodes indiquées au paragraphe suivant. Les dispositifs factoriels adoptés ont été du type 2^2, deux groupes

---

(I) Poudre de cellulose pour chromatographie (DURIEUX)

de facteurs ayant été testés séparèment : apport de cellulose et apport de P minéral d'autre part. Les résultats des expériences ont été analysés suivant la méthode simplifiée proposée par BECK et al., (1969).

Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons calculé l'accroissement de la teneur en enzymes (I) des sols ayant reçu un apport de cellulose.

L'accroissement de la teneur en C_I dû à l'enrichissement en cellulose est défini par la différence :

$$Z_I = E1C - E1$$

où E1C représente la teneur en C_I des sols enrichis en cellulose après l'incubation de 10 jours, et E1 représente la teneur en C_1 des sols non enrichis en cellulose.

On définit de même l'accroissement de la teneur en C_x dû à l'enrichissement en cellulose :

$$Z_x = EXC - EX$$

où EXC représente la teneur en C_x des sols enrichis en cellulose après l'incubation de 10 jours, et EX représente la teneur en C_x des sols non enrichis en cellulose.

L'accroissement de la teneur en β-glucosidase dû à l'enrichissement en cellulose est calculé comme suit :

$$ZB = EBC - EB$$

où EBC représente la teneur en β-glucosidase des sols enrichis en cellulose après l'incubation de 10 jours, et EB représente la teneur en β-glucosidase des sols non enrichis.

(I) Ce que nous dosons dans nos échantillons est le produit de l'activité des enzymes ; il ne s'agit pas exactement de la "teneur en enzymes" mais d'une quantité qui lui est proportionnelle.

IV. RESULTATS

A - Etude de l'équipement enzymatique des sols

Il ressort de la figure 24 pour les cellulases (C_1 ; C_x et β-glucosidase), de la figure 25 pour la phosphatase, et de la figure 26 (uréase), des tableaux XI et XII, que les trois sols organiques sont caractérisés par des teneurs en cellulase C_1 sensiblement équivalentes, mais qu'ils diffèrent par le fait que les deux sols acides (tourbe acide H_1 et mor MR) présentent des teneurs en C_x plus élevées que le sol calcique (tourbe calcique G_1) de sorte que le rapport "teneur en C_1 : teneur en C_x" est plus faible dans les sols acides que dans les sols calciques. Il semble que dans la tourbe calcique, les microorganismes possèdent un système enzymatique différent de ceux des tourbes acides. Ils produisent en particulier moins de C_x et plus de C1.

Reese (1952) a montré, dans un milieu tamponné par CO_3Ca que l'enzyme C_x ne s'accumule pas. En ce qui concerne l'uréase et la phsophatase, les sols acides (H_1 et MR) se distinguent du sol calcique (G_1) par le fait que chez les deux premiers (H_1 et MR), le rapport "teneur en phosphatase : teneur en uréase" est plus élevé que chez le troisième (G_1) (tableau XII).

B - Etude expérimentale de l'influence de l'adjonction de cellulose avec ou sans N ou P sur la teneur en C_1, C_x et β-glucosidase.

1.- Influence de l'apport de cellulose seule

L'apport de cellulose seule (c'est-à-dire en l'absence d'adjonction de N ou P) accroît significativement la teneur des différents sols en enzymes intervenant dans la dégradation de la cellulose, exception faite de la β-glucosidase dans le cas du mor (tableau XI et fig. 27, 28,29).

2.- Influence des apports de N et P

Les données, dont les moyennes figurent au tableau X1, ont été soumises à une analyse statistique qui met en évidence les interactions et effets principaux (libres d'interaction) significatifs suivant aux seuils de 0,05 (*) ou 0,01 (**) :

Tableau XI - INFLUENCE DE DIFFERENTS ENRICHISSEMENTS SUR LES TENEURS EN C_1, Cx ET β-GLUCOSIDASE DES TROIS SOLS ORGANIQUES APRES UNE INCUBATION DE 10 JOURS A 28° C.

	Enrichissement	Tourbe acide H_1	Tourbe calcique G_1	MR
Teneur en C_1	Aucun	0,276	0,305	0,259
	N	0,282	0,335	0,285
	P	0,285	0,413	0,256
	Cellulose	0,399	0,317	0,451
	Cellulose + N	0,547	0,389	0,477
	Cellulose + P	0,683	0,735	0,312
Teneur en Cx	Aucun	0,883	0,243	0,619
	N	0,925	0,331	0,973
	P	1,070	0,434	0,827
	Cellulose	1,060	0,382	1,150
	Cellulose + N	1,661	0,463	2,043
	Cellulose + P	2,033	1,426	1,848
Teneur en β-glucosidase	Aucun	0,259	0,082	0,250
	N	0,259	0,097	0,259
	P	0,307	0,094	0,250
	Cellulose	0,281	0,103	0,248
	Cellulose + N	0,292	0,106	0,261
	Cellulose + P	0,307	0,130	0,266

N.B. Les chiffres sont les moyennes de deux répétitions. Les teneurs sont exprimées en fonction du carbone du sol.

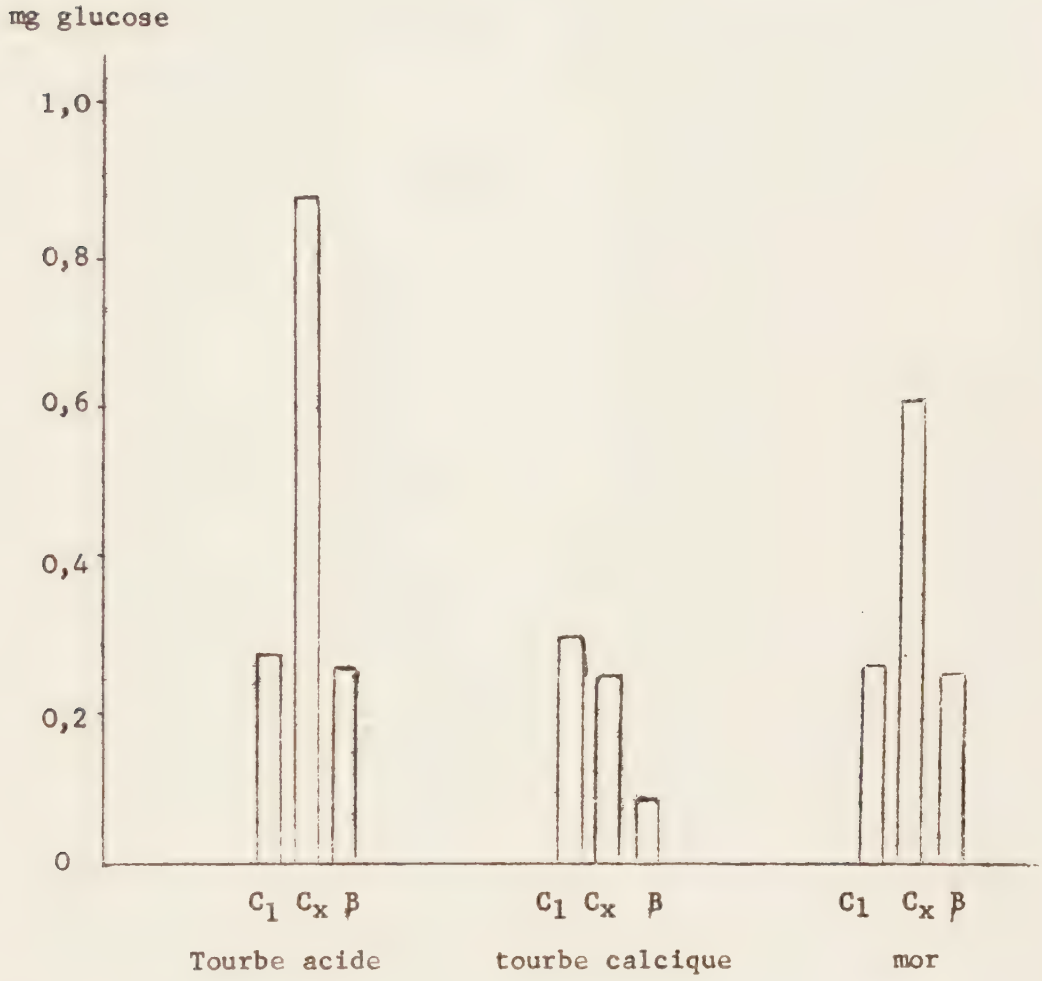


Figure 24 - Teneurs en C_1, C_x et β-glucosidase des trois sols organiques.

Sucres réducteurs formés exprimés en mg de glucose par 100 mg de C du sol.

Temps de réaction :

C_1	:	5 jours
C_x	:	22 heures
β-glucosidase	:	3 heures

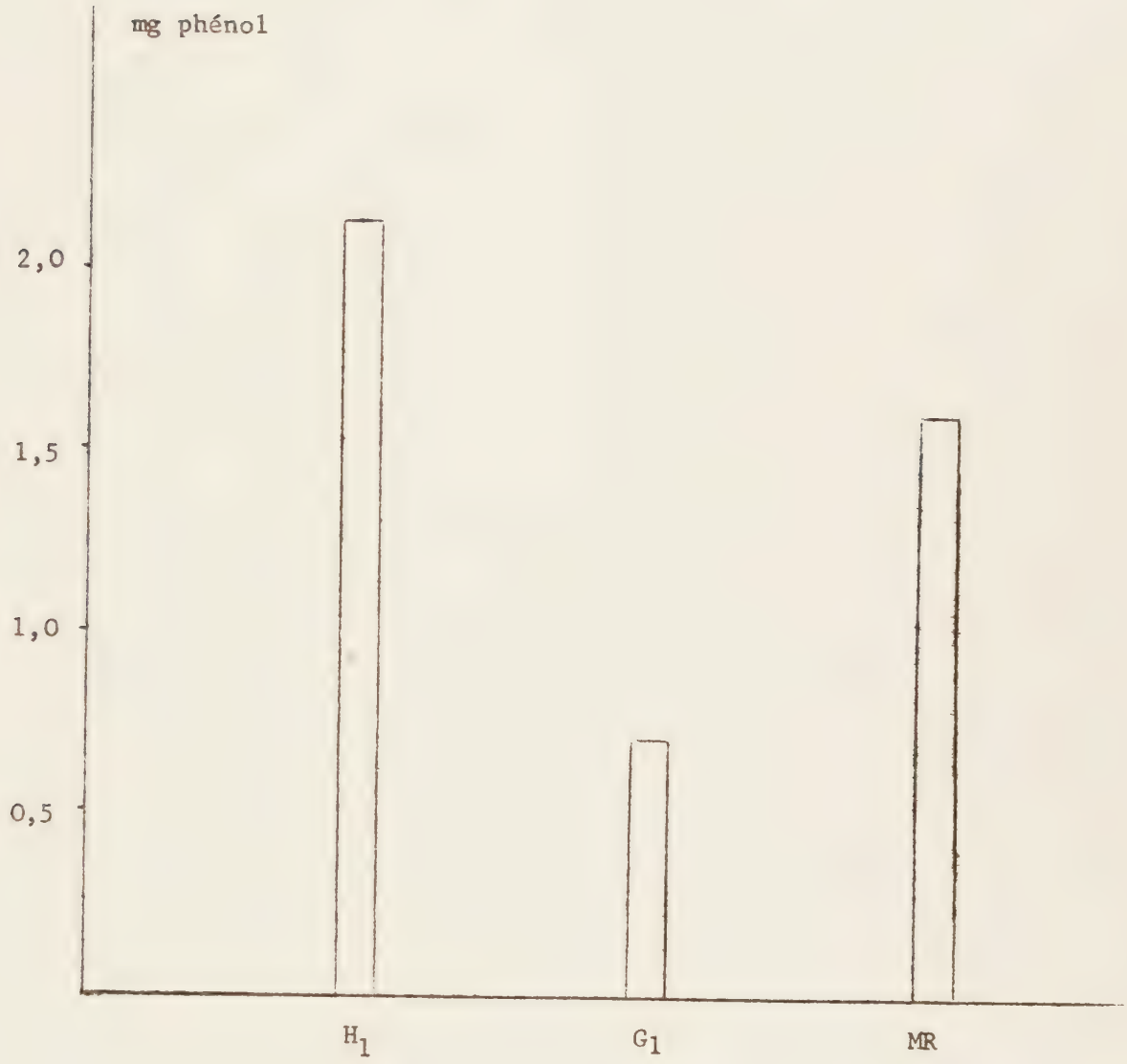


Fig. 25 - Teneurs en phosphatase des trois sols organiques
Activité phosphatasique exprimée en mg de phénol par 100 mg de C du so
temps de réaction : 3 heures.

H_1 : tourbe acide du Hohneck

G_1 : tourbe calcique de Saint-Gond.

MR : Mor.

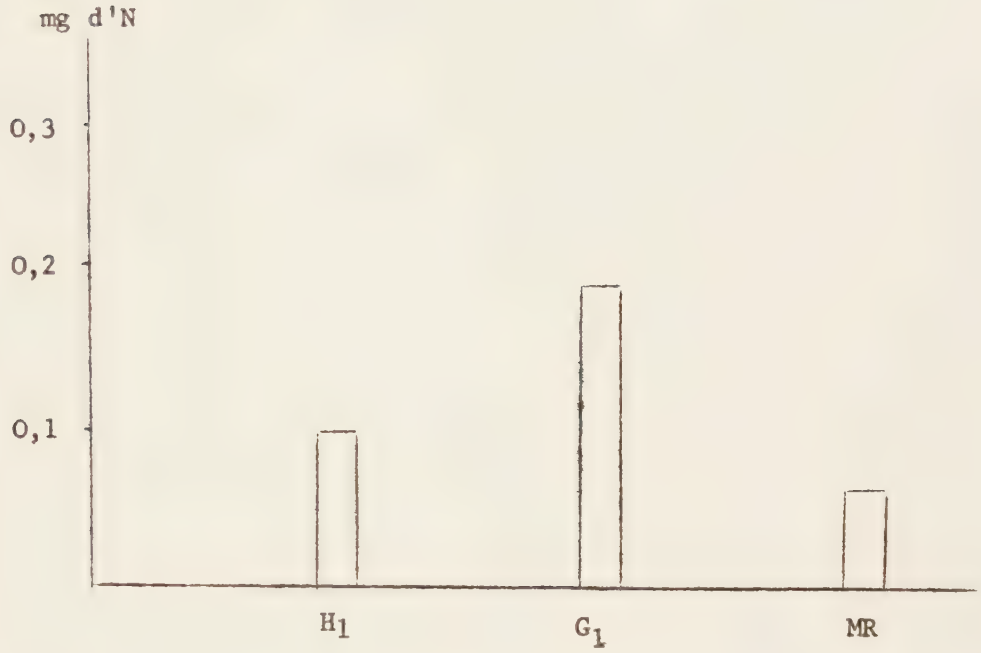


Figure 26 - Teneur en uréase des trois sols organiques

Résultats exprimés en mg d'N/1oo mg C du sol/3 h.

H_1 : tourbe acide du Hohneck

G_1 : tourbe calcique de Saint-Gond

MR : Mor d'un podzol des Vosges

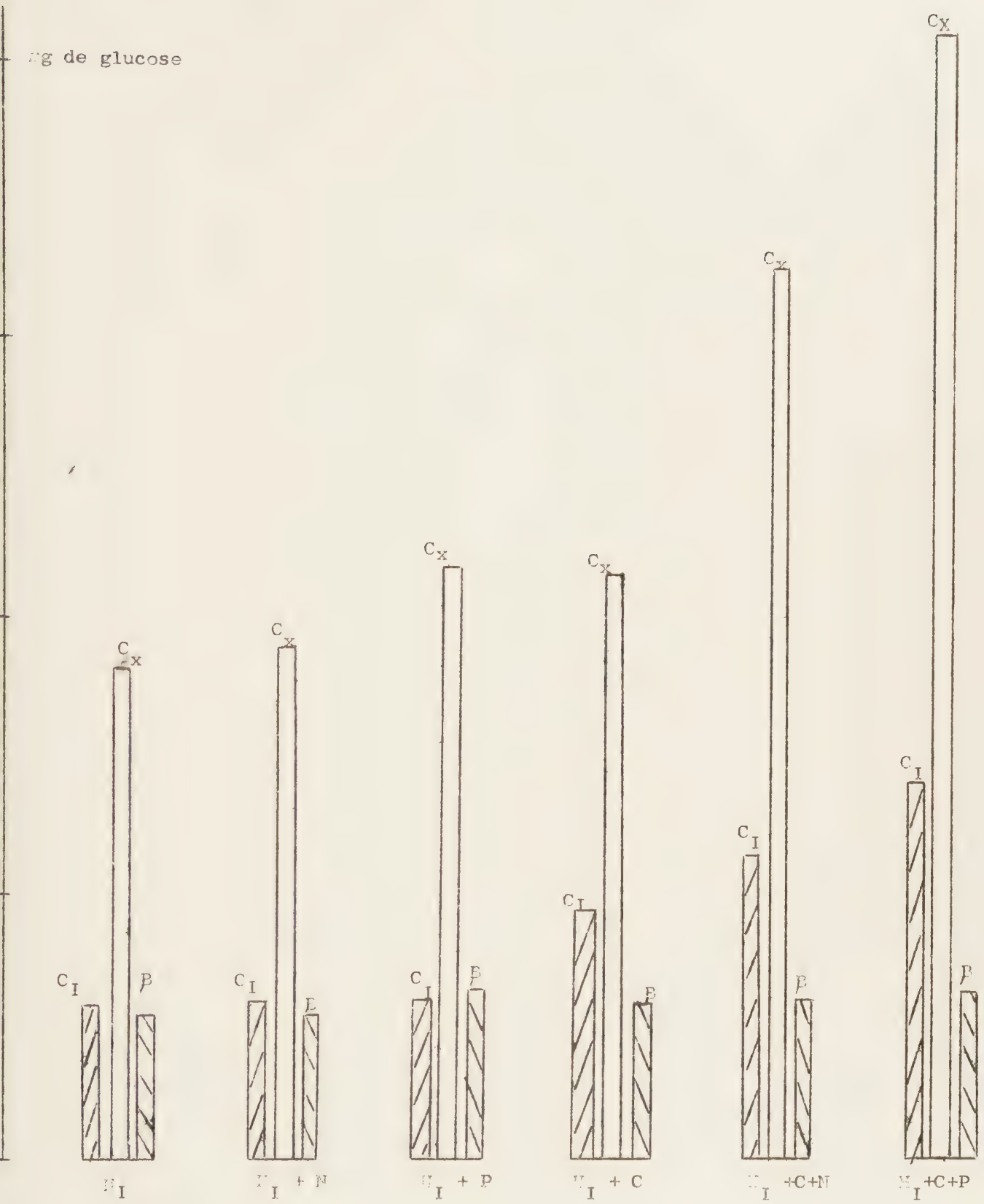


Figure 27 - Influence de différents enrichissements (N, P et cellulose) sur les teneurs en C_I, C_x et β-glucosidase de la tourbe acide du Hohneck, exprimées en mg de glucose par 100 mg de C du sol pour les durées de réaction, voir fig. 24.

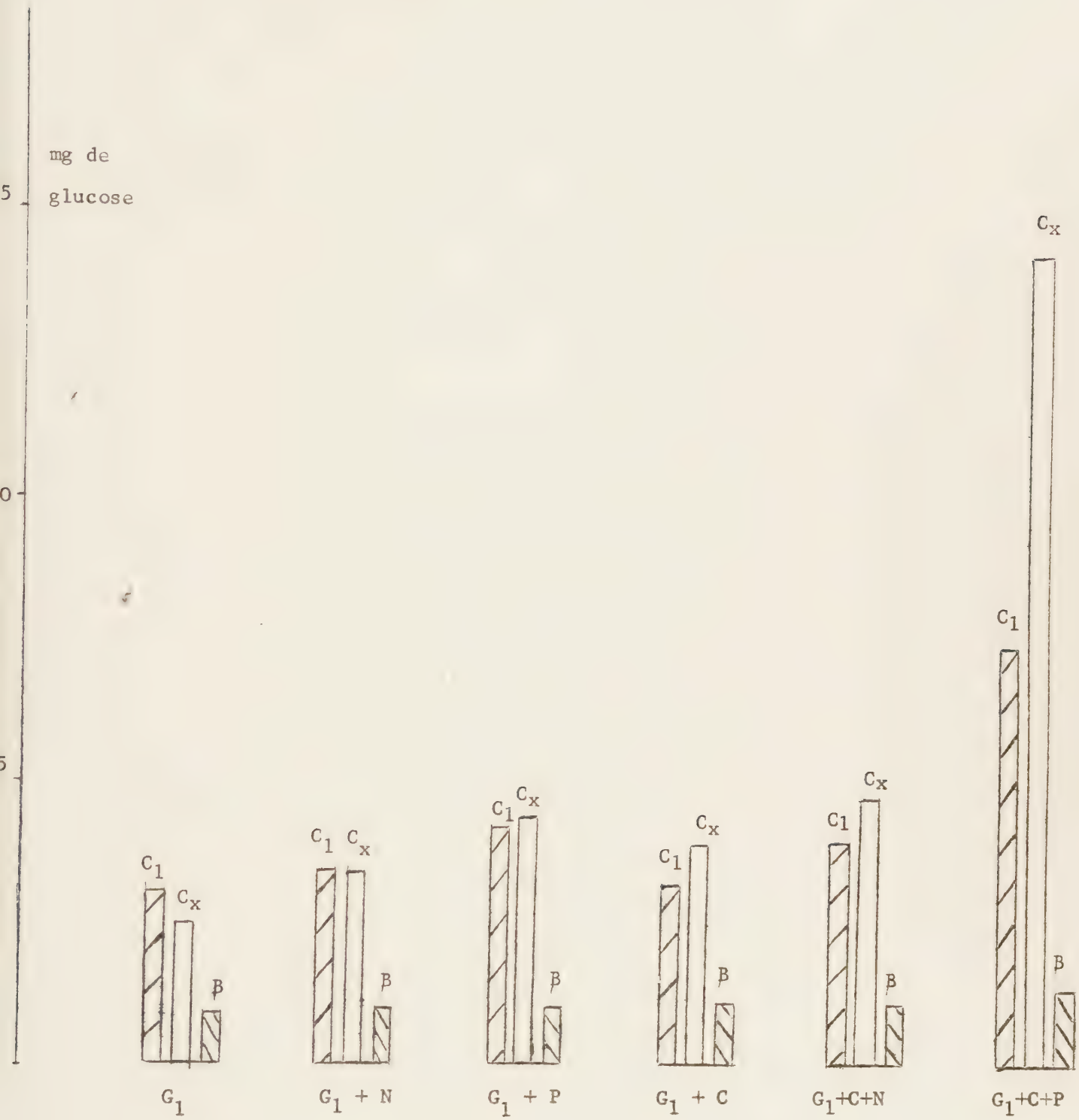


Figure 28 - Influence de différents enrichissements(N, P et cellulose) sur les teneurs en C_1, C_x et β-glucosidase de la tourbe calcique de Saint-Gond.

Sucres réducteurs formés exprimés en mg de glucose par 100 mg de C du sol. Pour les durées de réaction, voir fig. 24.

a. Tourbe acide

(I) Fraction C_I

Interaction "cellulose x N" (*)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	pas d'apport	0,276	0,399
	apport	0,282	0,547

Effet principal de P (*)

Phosphore	
pas d'apport	apport
0,338	0,484

(2) Fraction C_X

Interaction "cellulose x N" (**)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	pas d'apport	0,883	I,060
	apport	0,926	I,66I

Interaction "cellulose x P" (**)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	0,883	I,060
	apport	I,070	2,033

(3) B-glucosidase

Interaction "cellulose x P" (*)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	0,259	0,28I
	apport	0,307	0,307

b. Tourbe calcique

(I) Fraction C_I

Interaction "cellulose x P" (**)

		cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	0,305	0,317
	apport	0,413	0,735

Effet principal de N (*)

N	
pas d'apport	apport
0,311	0,362

(2) Fraction C_X

Interaction "cellulose x P" (**)

		cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	0,243	0,382
	apport	0,434	1,426

(3) B-glucosidase

Effet principal de P (**)

P	
pas d'apport	apport
0,092	0,112

c. Cor

(I) Fraction C_I

Effet principal de N (*)

pas d'apport	apport
0,355	0,381

(2) Fraction C_x

Interaction "cellulose x N" (**)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
N	pas d'apport	0,619	1,150
	apport	0,973	2,043

Interaction "cellulose x P" (**)

		Cellulose	
		pas d'apport	apport
P	pas d'apport	0,619	1,150
	apport	0,827	1,848

(3) B-glucosidase

Aucun effet significatif

Figure 29 - Influence de différents enrichissements (N, P, et cellulose) sur les teneurs en C_1, C_x, et β-glucosidase du Mor d'un podzol des Vosges.

Sucres réducteurs formés exprimés en mg de glucose par 100 mg C du sol. Pour les durées de réaction, voir fig. 24.

Nous considérons que les modifications d'activité enzymatique qui ne mettent pas significativement en cause l'apport de cellulose ne présentent pas d'intérêt pour l'étude du problème qui nous préoccupe, c'est-à-dire la cellulolyse ; c'est pourquoi nous discuterons uniquement des interactions où l'apport de cellulose est impliqué. Pour faciliter l'interprétation de ces données, nous avons transformé les teneurs brutes en enzymes qui figurent ci-dessus, accroissement des teneurs en enzymes tels qu'on les a définis plus haut. Ces données transformées ont été regroupées au tableau XIII où nous avons également fait figurer, à titre comparatif, les résultats d'une partie (expérience n° 2) de l'étude respirométrique publiée antérieurement (KONG et DOMMERGUES, 1970 a).

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

1. - L'étude de l'équipement enzymatique des sols organiques fait ressortir les deux faits suivants (fig.24 et25, tableaux XI et XII) :

(1) La tourbe acide et le mor sont caractérisés par un rapport "teneur en cellulase (C_1) : teneur en CMCase (C_x)" inférieur à celui de la tourbe calcique ; ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par l'analyse respirométrique antérieure d'où il découle que le rapport "accroissement de l'absorption d'O_2 dû à la cellulolyse : accroissement de l'absorption d'O_2 dû à la CMClyse" $\frac{RO_2}{R'O_2}$ est plus faible dans les tourbes acides et le mor que dans les tourbes calciques (KONG et DOMMERGUES, 1970 b).

(2)La tourbe acide et le mor sont caractérisés par un rapport "teneur en phosphatase : teneur en uréase" plus élevé que celui de la tourbe calcique (tableau XII). Des recherches en cours portant sur la comparaison de mor et de mull calciques dans des sols forestiers de l'Est de la France, confirment que ce rapport "teneur en phosphatase : teneur en uréase" est plus élevé dans les mor que dans les mulls calciques. Nous verrons plus bas que la faible teneur en phosphatase de la tourbe calcique pourrait - au moins en partie - être la cause de la déficience de ce sol en P minéral soluble.

2. - L'étude expérimentale concernant l'effet d'apports de N ou P sur l'accroissement de la teneur en enzymes des sols enrichis en cellulose (tableau XIII) met en évidence les faits suivants :

a. Tourbe acide :

L'accroissement de la teneur en cellulase (Z_1) passe de 0,123 dans le cas de l'apport de cellulose seule à 0,263 dans le cas de l'apport de cellulose et azote.

L'accroissement de la teneur en C_x est encore plus sensible à l'apport d'N puisqu'il passe de 0,177 sans N à 0,735 avec N ; il est également sensible à l'apport de P puisqu'il passe de 0,177 en l'absence de P à 0,963 en présence de P. On est ainsi amené à conclure que, dans la tourbe acide, c'est surtout la production d'enzymes intéressant la deuxième étape de la cellulolyse (C_x) qui est handicapée par les carences en N et P. Ce résultat est apparemment en contradiction avec le résultat de l'étude respirométrique (expérience n° 2) présentée au chapitre précédent, d'où l'on avait déduit que, dans les sols organiques, la limitation de

Tableau XII - EQUIPEMENT ENZYMATIQUE DES SOLS ORGANIQUES

	Rapport : $\frac{\text{teneur en } C_1}{\text{teneur en } Cx}$	Rapport : $\frac{\text{teneur en phosphatase}}{\text{teneur en uréase}}$
Tourbe acide (H_1)	0,31	20,78
Tourbe calcique (G_1)	1,25	3,75
Mor de podzol (MR)	0,42	26,14

Tableau XIII - INFLUENCE DE L'ADJONCTION DE N OU P SUR L'ACCROISSEMENT DE LA TENEUR EN ENZYMES ET SUR L'ACCROISSEMENT DE L'ABSORPTION D'O_2 DUS A L'ENRICHISSEMENT EN CELLULOSE.

	Tourbe acide (H_1)	Tourbe calcique (G_1)	Mor de podzol (MR)
Accroissement de la teneur en C_1 (Z_1)	sans N : 0,123 avec N : 0,265	sans P : 0,012 avec P : 0,322	NS
Accroissement de la teneur en Cx (Z_x)	sans N : 0,177 avec N : 0,735 sans P : 0,177 avec P : 0,963	sans P : 0,131 avec P : 0,992	sans N : 0,531 avec N : 1,070 sans P : 0,531 avec P : 1,021
Accroissement de la teneur en β-glucosidase (Z_β)	sans P : 0,022 avec P : 0	NS	NS
Accroissement de l'absorption d'O_2 : (RO_2) (1)	sans N : 1,21 avec N : 9,33 sans P : 1,20 avec P : 3,79	sans P : 2,30 avec P : 11,72	sans N : 2,01 avec N : 4,08 sans P : 4,02 avec P : 1,70

(1) Résultat de l'étude respirométrique effectuée antérieurement sur les mêmes échantillons de sol (expérience nº 2)

NS = non significatif

cellulolyse affecte en premier chef la première étape de la dégradation de la cellulose. En fait, il ne faut pas perdre de vue que la méthode respirométrique concerne l'activité cellulolytique globale (des microorganismes vivants et des enzymes du sol) alors que l'analyse enzymatique utilisée ici concerne seulement l'activité cellulolytique des enzymes du sol. Il faut donc admettre que, dans la tourbe acide, l'activité des différents enzymes cellulolytiques du sol n'est pas limitée par les mêmes facteurs que ceux qui régissent l'activité des différents microorganismes cellulolytiques.

En ce qui concerne la teneur en β-glucosidase, elle n'est modifiée significativement ni par l'apport de cellulose seule, ni par l'apport de cellulose avec N ou P (fig. 27).

b. Tourbe calcique : C'est exclusivement l'apport de P qui favorise l'élévation du stock de C_1 et C_x. L'accroissement de la teneur en C_1 (Z_1) passe en effet de 0,012 dans les sols enrichis en cellulose seule, à 0,322 dans les sols enrichis en cellulose et P. Il en est de même pour la teneur en C_x : l'accroissement de la teneur en C_x (Z_x) passe de 0,139 dans les sols enrichis en cellulose seule, à 0,992 dans les sols enrichis en cellulose et P. Ces résultats confirment parfaitement les études respirométriques (expériences n° 2 et n° 3 antérieures). Dans la tourbe calcique, P minéral soluble constitue donc le facteur limitant l'accumulation de C_1 et de C_x, c'est-à-dire des enzymes intervenant dans les deux premières étapes de dégradation de la cellulose. Il est également intéressant de rapprocher ces données du fait que la teneur de la tourbe calcique en phosphatase est relativement très faible (fig. 25), la carence en P minéral soluble de sol pouvant donc s'expliquer soit par une faible teneur en substrats intéressant la phosphatase, soit par une inhibition de l'activité de cet enzyme.

Comme dans le cas précédent, la teneur en β-glucosidase n'est pas modifiée par l'apport de cellulose, que cet apport soit accompagné ou non de N ou P (fig. 28).

c.- Dans le mor de podzol, les teneurs en cellulase et β-glucosidase ne sont pas non plus modifiées par l'apport de cellulose, que cet apport soit accompagné ou non de N ou P (fig. 29). Quant à la teneur en C_x, elle est fortement accrue par l'apport de cellulose seule (Z_x = 0,531). Bien qu'un apport complémentaire de N ou P élève encore cette teneur (Z_x = 1,070 avec N ; Z_x = 1,021 avec P), on ne peut dire qu'il existe dans ce sol une carence importante en N ou P ; c'est d'ailleurs ce que confirme l'étude respirométrique.

En ce qui concerne la β-glucosidase, on fera la même remarque que dans les deux sols précédents.

Chapitre IV : ANTAGONISME ENTRE LA MICROFLORE CELLULOLYTIQUE ET LA MICROFLORE NON CELLULOLYTIQUE DANS LES SOLS ORGANIQUES

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que N et P constituent souvent des facteurs limitants de l'activité cellulolytique dans les sols organiques. La question se pose alors de savoir quelle est l'origine de ces déficiences en N et P assimilables par les microorganismes cellulolytiques.

Parmi les mécanismes de nature biologique que l'on peut imaginer, celui de la compétition vis à vis de ces éléments nutritifs et celui de l'antibiotisme vienent immédiatement à l'esprit. C'est pourquoi nous avons cherché ici, à l'aide de modèles simplifiés, à déceler si la microflore non cellulolytique pouvait manifester de tels antagonismes vis à vis de la microflore cellulolytique.

I. ETUDE DE L'ANTAGONISME PAR COMPETITION POUR N OU P

1 - Matériel et méthodes

A - Matériel

Les sols organiques sont une tourbe acide (H_1), une tourbe calcique (G_1) et un mor (MR) que nous avons comparés, dans certains cas, à un sol non organique : sol brun calcaire (SBC). Nous ne reviendrons pas sur les caractéristiques de ces sols décrits antérieurement

B - Technique d'étude de la compétition pour N ou P

Cette technique est fondée sur la mesure de l'activité cellulolytique d'un microorganisme test (Trichoderma viride) cultivé dans des milieux carencés en N ou P auxquels on ajoute

(1) des doses croissantes de N ou P

(2) des extraits stériles ou non des différents sols.

Lors de l'adjonction d'extraits stériles de sols, on a affaire à une culture pure de Trichoderma viride. Lors de l'adjonction d'extraits non stériles, on a affaire à une culture complexe de Trichoderma viride en présence de la microflore totale des sols considérés ; c'est dans ce cas (culture complexe) que l'on peut mettre éventuellement en évidence la manifestation d'antagonismes entre T. viride et des éléments de la microflore totale introduite dans le milieu.

a. Isolement du microorganisme cellulolytique test : Trichoderma viride.

Ce champignon cellulolytique-fréquent dans les sols tourbeux- a été isolé de la tourbe acide du Beillard sur des pièges cellulolytiques mis en place in situ
Après avoir été prélevés, ces disques, qui ne présentent aucune trace de cellulolyse, ont été placés à la surface de plaques de silicogel enrichi avec deux gouttes de milieu liquide de Norkrans (1962)(1)

Au bout de 10 jours, des colonies blanchâtres sont apparues à partir desquelles les isolements et identifications ont été effectués. La vérification du pouvoir cellulolytique de Trichoderma viride a été faite sur milieu Norkrans gélosé enrichi en poudre de cellulose à la dose de 5×10^{-3}, le milieu devenant translucide autour des colonies. Les Trichoderma viride ont été conservés par la suite sur milieu liquide de Norkrans.

---

(1) Milieu liquide de Norkrans :

Cellulose en poudre pour chromatographie(Durieux)	5,0 g
$NH_4H_2PO_4$	2,0 g
KH_2PO_4	0,6 g
K_2HPO_4	0,4 g
$MgSO_4, 7H_2O$	0,5 g
$CaCl_2$	0,1 g
Citrate ferrique (dissous dans l'acide citrique)	10 mg
$ZnSO_4, 7H_2O$	4,4 mg
$MnSO_4, 4H_2O$	5 mg
$CaCl_2, 6H_2O$	1 mg
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH	5,8

b. Préparation des extraits de sol

Le sol a été filtré sur verre fritté n° 2 à l'aide d'une pompe à vide ; on a obtenu un liquide plus ou moins coloré que l'on a centrifugé à 4 000 tours par minute pendant 10 minutes : le surnageant a constitué l'extrait de sol non stérile. Les extraits de sol non stériles ont été désignés par les lettres EH_a(tourbe acide du Hohneck H_1), EGa (tourbe calcique de Saint-Gond G_1), EMa (mor MR).

Une fraction d'extrait de sol non stérile a été passée sur membrane Millipore, pour obtenir l'extrait de sol stérile. Les extraits de sols stériles ont été désignés par les lettres EHb (tourbe acide du Hohneck H_1), EGb (tourbe calcique de Saint-Gond G_1) et EMb (mor MR).

c. Milieux d'étude de la compétition

(1) Compétition vis à vis de l'azote

On a préparé une série d'Erlenmeyers de 150 ml dans chacun desquels on a versé 10 ml de la solution suivante (milieu de Norkrans concentré deux fois, carencé en azote et sans cellulose :

KH_2PO_4	1,2 g
K_2HPO_4	0,8 g
$MgSO_4 7H_2O$	1,0 g
$CaCl_2$	0,2 g
Citrate férrique (dissous dans l'acide citrique).....	20 mg
$ZnSO_4$ 7 H_2O	8,8 mg
$MnSO_4$. $4H_2O$	10 mg
$CaCl_2$. $6H_2O$	2 mg
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 5,8	

Dans chaque Erlenmeyer, on a ajouté 100 mg de cellulose en poudre Durieux et 10 ml d'extrait de sol non stérile ou d'extrait de sol stérile.

On a ensuite apporté dans les différents Erlenmeyers des doses croissantes d'azote à l'aide de solutions de chlorure d'ammonium, de façon à amener les teneurs en azote aux niveaux suivants : 0, 100, 200, 1 000, 2 000 x 10^{-6}. Le pH des différents milieux a été ajusté à 5,8.

(2) Compétition vis à vis du phosphore

Première expérience

On a préparé une série d'Erlenmeyers de 150 ml dans chacun desquels on a versé 10 ml de la solution suivante (milieu de Norkrans dilué 5 fois, sans cellulose) :

$NH_4H_2PO_4$	0,4	g
KH_2PO_4	0,12	g
K_2HPO_4	80	mg
$MgSO_4 . 7H_2O$	100	mg
$CaCl_2$	20	mg
Citrate ferrique(dissous dans l'acide citrique)	2	mg
$ZnSO_4 . 7H_2O$	1	mg
$MnSO_4 . 4H_2O$	1	mg
$CaCl_2 . 6H_2O$	0,2	mg
Eau distillée q.s.p.	1000	ml.

Dans chaque Erlenmeyer, on a ajouté 100 mg de cellulose en poudre Durieux et 10 ml d'extrait de sol non stérile ou d'extrait de sol stérile. On a ensuite apporté des doses croissantes de phosphore sous forme d'un tampon au phosphate au pH 5,8 de façon à ce que les doses finales de phosphore dans le milieu soient de 44, 144, 244, 1044, 2044 x 10^{-6}.

Deuxième expérience

On a préparé une série d'Erlenmeyer de 150 ml dans chacun desquels on a versé 10 ml de la solution suivante :

NH_4Cl	1,86	g
K_2SO_4	1,56	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	1,00	g
$CaCl_2$	0,2	g
Citrate ferrique (dissous dans l'acide citrique)	20	mg
$ZnSO_4 . 7H_2O$	8,8	mg
$MnSO_4 . 4H_2O$	10	mg
$CaCl_2 . 6H_2O$	2	mg
Eau distillée q.s.p.	1000	ml
pH 5,8		

Des doses croissantes de P ont été apportées de façon à obtenir des concentrations dans le milieu de 0, 100, 200, 1 000, 2 000 x 10^{-6}.

Les milieux ont été ensemencés avec 0,2 ml d'une suspension de T. viride provenant d'une culture âgée de 10 jours.

Au bout de 7 jours d'incubation à 28° C, les cultures ont été centrifugées et filtrées. Sur les filtrats on a dosé la cellulase suivant la technique décrite au paragraphe suivant.

d. Détermination du seuil d'azote ou de phosphore

Par seuil d'N ou P, nous entendons la quantité minimale de N ou P qu'il faut ajouter à un milieu carencé en N ou P pour que se manifeste l'activité cellulolytique de Trichoderma viride cultivé seul (Sb) ou en présence de la microflore totale de sols organiques (Sa). Cette activité cellulolytique a été évaluée non pas en dosant les hydrates de carbone solubles formés pendant l'incubation de la cellulose ensemencée avec T. viride, mais en dosant la cellulase accumulée dans le milieu au cours de cette incubation ; en effet, la détermination des hydrates de carbone solubles résultant de l'hydrolyse de la cellulose ne permet pas de se faire une idée précise de l'activité cellulolytique, car les hydrates de carbone peuvent être réutilisés par le champignon test (T. viride) ou par la microflore compétitive elle-même.

La cellulase est dosée comme suit :

Dans un tube à essai, on verse 8 ml de solution tampon-phosphate à pH 5,0, contenant 0,25 % de cellulose préparée par précipitation selon la méthode de Norkrans (1962)*, 0,01 % de merthiolate et 2 ml du filtrat de la culture de 7 jours. Les sucres réducteurs sont dosés suivant la méthode à l'acide dinitro-salicylique (SUMNER et SOMERS, 1944) après 24 heures d'incubation à 37° C et filtration. C'est parce que le degré de polymérisation - environ 300 - de la cellulose préparée suivant la méthode de Norkrans est faible, que la durée d'incubation de 24 heures est suffisante.

---

* 3 grammes de poudre de cellulose (Durieux) sont dissous dans une solution contenant 125 ml d'hydroxyde d'ammonium, 9,4 g de $CuCO_3$ et 30 ml d'eau distillée. Quand la cellulose est complètement dissoute elle est immédiatement diluée par cinq litres d'eau dans un récipient de 15 litres ; puis la solution est neutralisée par l'addition de HCl dilué (500 ml de HCl concentré dans 10 litres d'eau) goutte à goutte, jusqu'à disparition de la couleur bleue du complexe cuivrique. On laisse reposer pendant une heure, puis le surnageant est décanté ou siphoné par un tube de latex. Le précipité est lavé plusieurs fois par une solution de tartrate de sodium et de potassium à 5 % jusqu'à ce que la couleur disparaisse complètement. La solution de cellulose préparée de cette façon possède un degré de polymérisation de l'ordre de 300, elle est homogène, sans trace d'impuretés (Norkrans et Randy, 1956).

Dans chaque série expérimentale, c'est à la teneur en cellulase y_0 correspondant aux milieux carencés (exception faite de la première expérience concernant la compétition pour P, dans lequel la teneur de référence était de 44×10^{-6} et non 0) qu'on a comparé les teneurs en cellulase y correspondant à des apports croissants de N ou P. Sur le plan de l'analyse statistique, il s'agit d'une comparaison de plusieurs traitements avec un témoin, comparaison pour laquelle on a adopté la méthode de DUNNETT (1957). Les tables de t établies par cet auteur permettent le calcul, à partir de l'écart types S de chaque série expérimentale de la tolérance (allowance) $A = ts\sqrt{2/N}$ où N représente le nombre de répétitions. Par définition, le seuil est atteint par une valeur y_s de la teneur en cellulase telle que

$$y_s = y_0 + A$$

A ces valeurs, des teneurs en cellulase y_s correspondent des valeurs S_a ou S_b des teneurs limites en N ou P ou, en d'autres termes, des seuils de N ou P tels qu'on les a définis antérieurement.

Pour le calcul des seuils, on a utilisé la table t de DUNNET correspondant à une probabilité de 0,05.

2 - Résultats

A - Compétition pour N

Lorsque T. viride est cultivé en présence d'extrait de tourbe acide stérile, le seuil de N à partir duquel il présente une activité cellulolytique significative est de 100 x 10^{-6} (fig. 30 a et tableau XIV). Mais lorsque T. viride est cultivé en présence du même extrait de tourbe, mais non stérile - c'est-à-dire en association avec la microflore totale de la tourbe acide, le seuil de N est beaucoup plus élevé soit 1025 x 10^{-6}. En d'autres termes, la microflore totale de la tourbe acide exerce à l'encontre de T. viride un effet compétitif en ce qui concerne N, effet compétitif qui commence seulement à être levé par une teneur minimale en N de 1025 x 10^{-6}. On notera que pour des teneurs en N de l'ordre de 2000x10^{-6}, la compétition a pratiquement disparu.

Les figures 30b et 30c montrent que la microflore totale de la tourbe calcique et celle du mor font preuve d'un ppuvoir compétitif médiocre.

B - Compétition pour P

Lorsque T. viride est cultivé en présence d'extrait de tourbe acide stérile, le seuil de P à partir duquel il présente une activité cellulolytique significative est de 232 x 10^{-6} (1ère expérience, fig. 31a et tableau XV) ou 16 x 10^{-6} (2e expérience, tableau XVI). Mais lorsque T. viride est cultivé en présence du même extrait de tourbe acide mais non stérile - c'est-à-dire en association avec la microflore totale de la tourbe acide - le seuil de P est beaucoup plus élevé, soit 1085 x 10^{-6} dans la première expérience (fig. 31a et tableau XV) et 82 x 10^{-6} dans la 2ème expérience (tableau XVI).

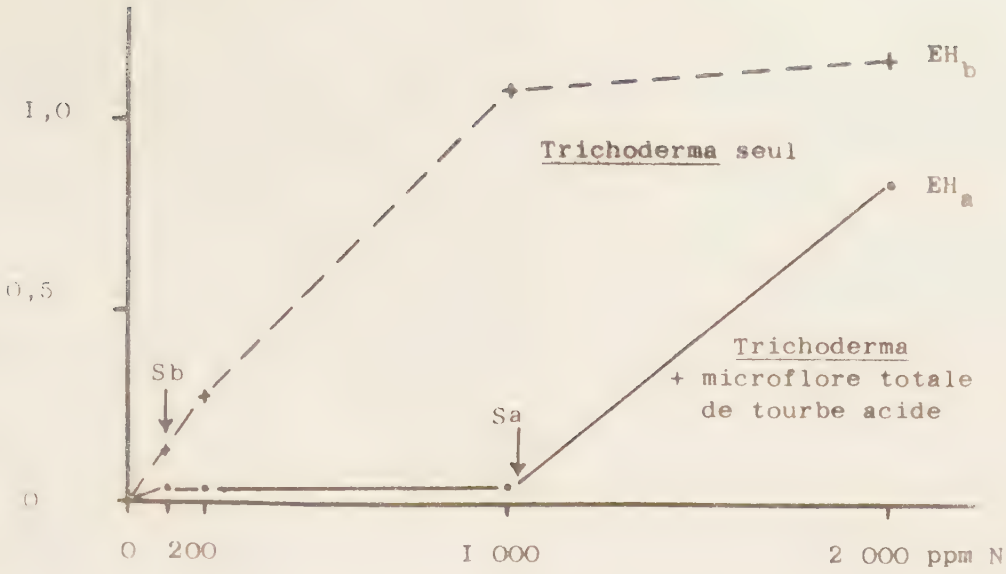
En d'autres termes, la microflore totale de la tourbe acide exerce vis-à-vis de T. viride un effet compétitif en ce qui concerne P, effet compétitif qui commence à être élevé seulement lorsque la teneur en P est suffisamment élevée soit 1085 x 10^{-6}, dans la 1ère expérience et 82 x 10^{-6} dans la 2ème expérience.

Fig. 30 : Production de cellulase par T. viride cultivé seul (milieux ayant reçu des apports d'extraits de sol non stériles EH_a, HG_a, EM_a) ou culture en présence de la microflore totale des trois sols (milieux ayant reçu des apports d'extraits de sols stérilisés par filtration sur Millipore EH_b, HG_b, EM_b) en présence de doses croissantes d'N (NH_4Cl).

La quantité de cellulase formée est exprimée en mg de glucose/ml de milieu de culture.

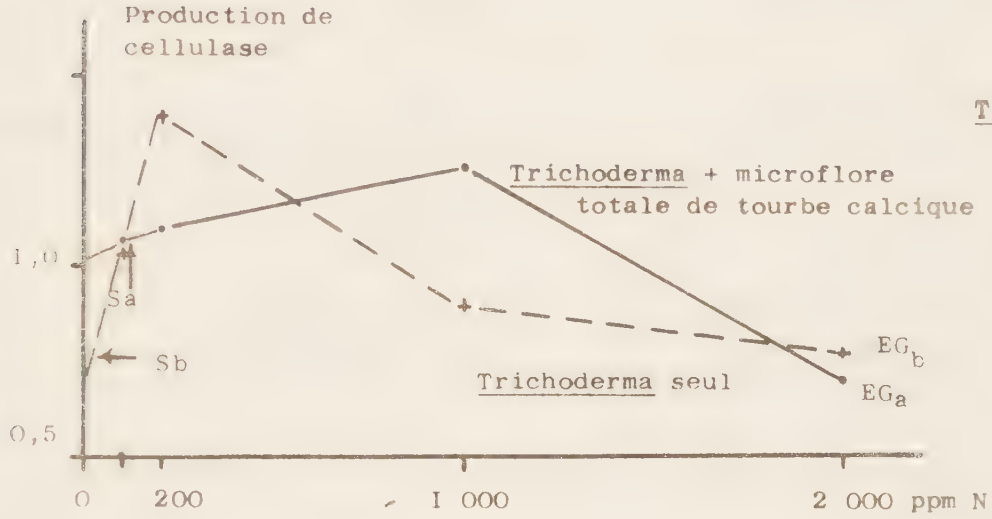
Les seuils d'N sont indiqués par les flèches Sa (T. viride + microflore totale) et Sb (T. viride seul).

Fig. 30 a



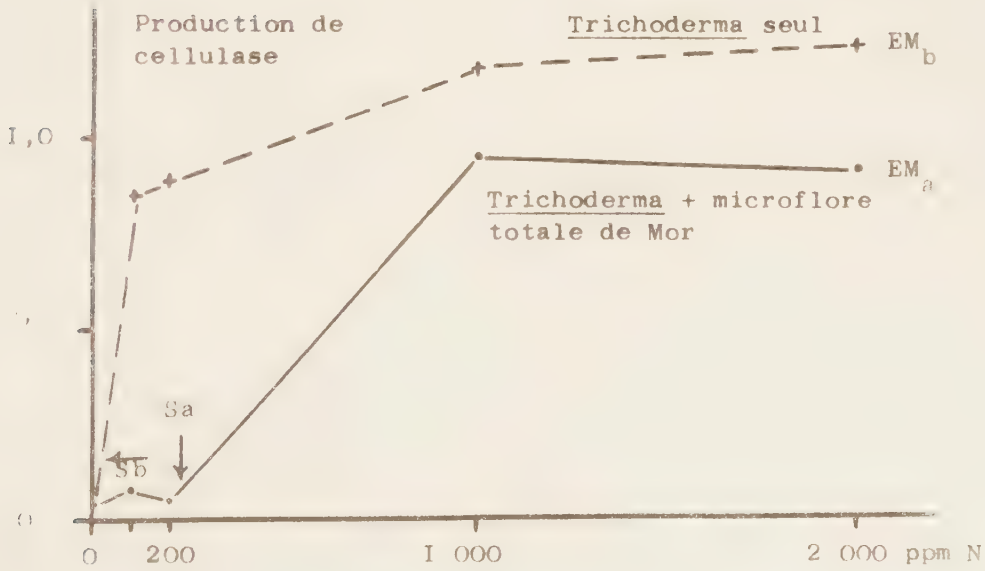
Tourbe acide
(Hohneck)

Fig. 30 b



Tourbe calcique
(St-Gond)

Fig. 30 c



Mor

Tableau XIV - Seuils d'azote (exprimés en 10^{-6} N) déterminés en présence des trois extraits de sol non stériles et stériles.-

	Extrait de sol non stérile (Sa)	Extrait de sol stérile (Sb)
xtrait de ourbe acide	1 025	100
xtrait de ourbe calcique	108	40
xtrait de mor	214	11

Tableau XV - Seuils de phosphore (exprimés en 10^{-6}P) déterminés en présence des trois extraits de sol non stériles et stériles.- (1ère expérience)

	Extrait de sol non stérile (Sa)	Extrait de sol stérile (Sb)
xtrait de ourbe acide	1 085	232
xtrait de ourbe calcique	584	68
xtrait de mor	1 117	404

Tableau XVI - Seuils de phosphore (exprimés en 10^{-6} P) déterminés en présence des trois extraits de sol non stériles et stériles.- (2ème expérience)

	Extrait de sol non stérile (Sa)	Extrait de sol stérile (Sb)
xtrait de ourbe acide	82	16
xtrait de ourbe calcique	infini	3
xtrait de mor	infini	15

Fig. 31 : Production de cellulase par T. viride cultivé seul (milieux ayant reçu des apports d'extraits de sol non stériles EH_a, HG_a, EM_a) ou culture en présence de la microflore totale des trois sols (milieux ayant reçu des apports d'extrait de sol stérilisés par filtration sur Millipore EH_b, HG_b, EM_b) en présence de doses croissantes de P (K_2HPO_4 et KH_2PO_4).

La quantité de cellulase formée est exprimée en mg de glucose/ml de milieu de culture.

Les seuils de P sont indiqués par les flèches Sa (T. viride + microflore totale et Sb (T. viride seul).

Fig. 31 a

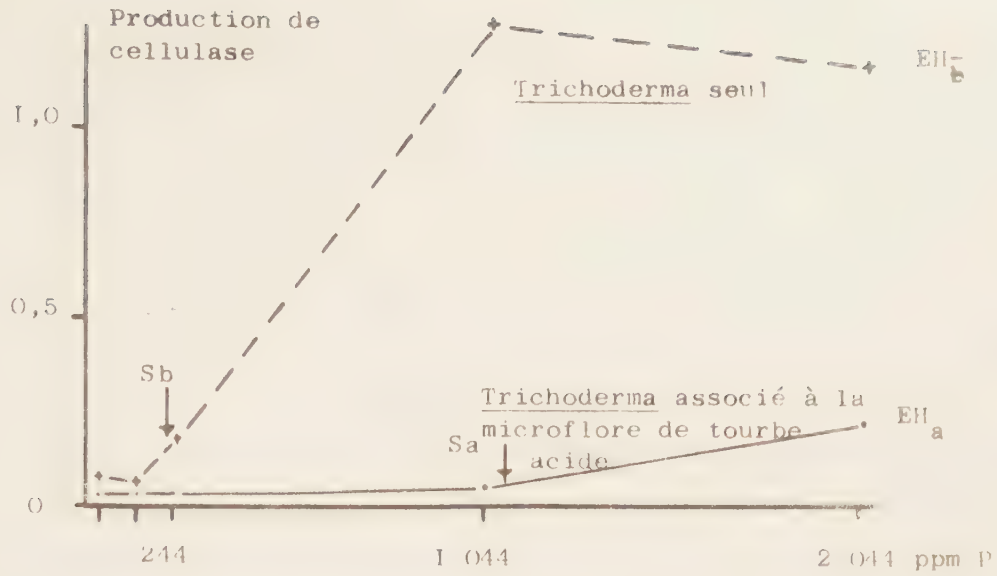


Fig. 31 b

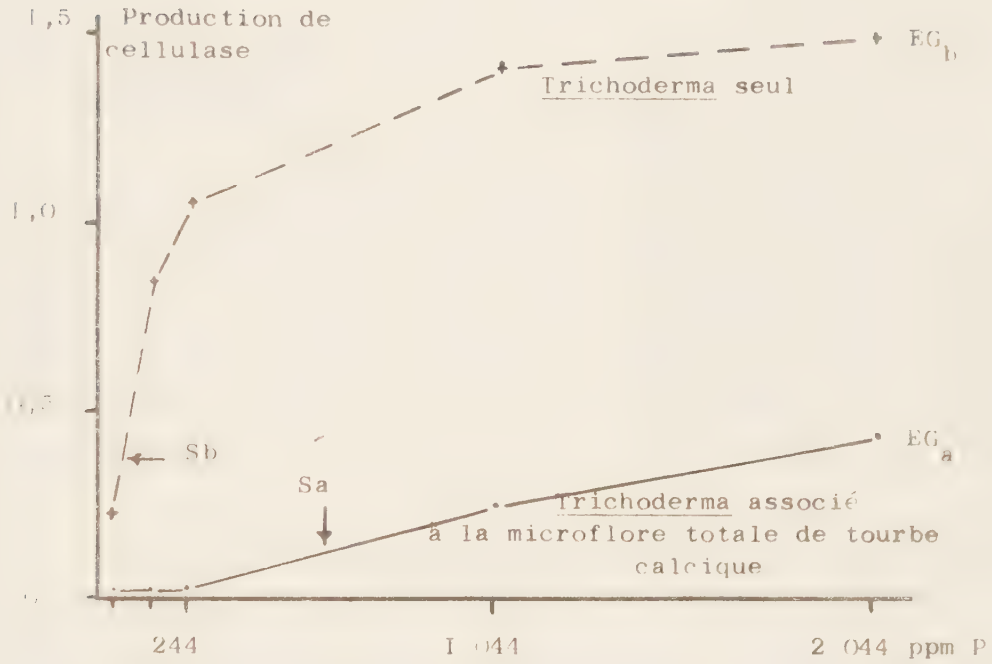
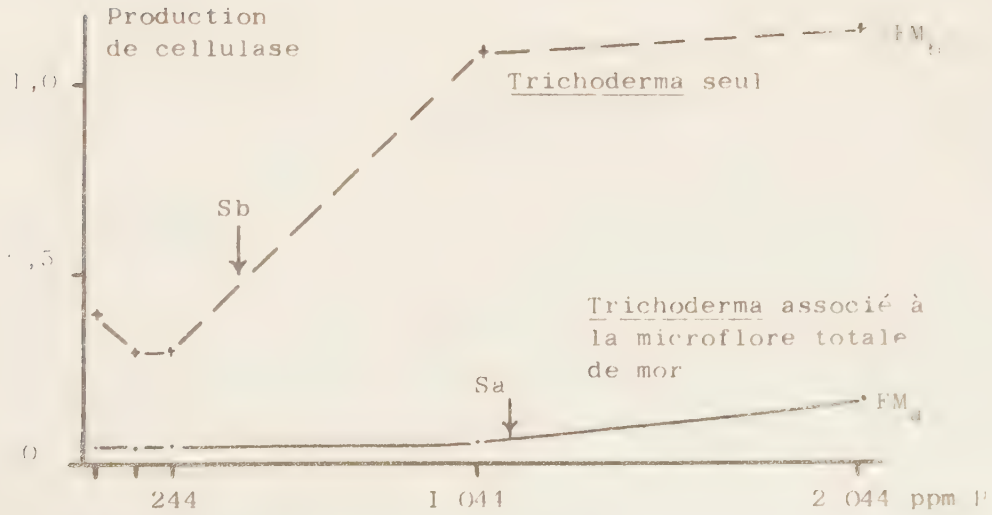


Fig. 31 c



En ce qui concerne les microflores totales de la tourbe calcique et du mor, elles exercent également une activité compétititive très vive vis-à-vis de T. viride (fig. 31 b et c et tableau XV et XVI.

Les figures suggèrent qu'en plus de cet antagonisme par compétition, il pourrait se manifester un antagonisme de nature antibiotique, car les doses élevées de P ne permettent pas au T. viride en culture mixte de rattraper la croissance de T. viride en culture pure (comme cela est le cas pour N avec la microflore totale de la tourbe acide).

II. ETUDE DE L'ANTAGONISME PAR ANTIBIOTISME

1 - Test préliminaire

La limitation de la cellulolyse dans les tourbes n'est pas seulement due à une insuffisance quantitative de la nutrition en azote et phosphore qui induit une compétition des microorganismes pour ces éléments ; elle peut en effet intervenir même dans des conditions de nutrition optimales, comme le montre le test suivant :

Dans un Erlenmeyer de 150 ml, on a mis 20 ml de milieu Norkrans * pour champignons cellulolytiques à pH 5,8 additionné de 100 mg de cellulose en poudre (Durieux), stérilisés séparément auparavant à l'autoclave.

Ce milieu est alors ensemencé avec 0,2 ml d'une suspension de mycélium de Trichoderma viride, et on met à incuber à 28° C. Dans ces conditions, le développement est rapide et la cellulolyse est mesurable, par simple pesée, au dixième jour : pour cela on filtre le contenu de la fiole, on le lave à plusieurs reprises avec de l'eau chaude (60°C) pour enlever les sucres solubles et glucose formés au cours de l'incubation (hydrates de carbone, oligosides, etc..);

---

* Composition du milieu Norkrans décrite page 89.

le résidu de cellulose est alors séché 48 heures à 80° C et pesé : ce poids résiduel de cellulose non attaquée donne, par comparaison au poids initial une évaluation rapide de l'intensité de la cellulolyse.

Cette méthode peut paraître critiquable par le fait qu'il est très difficile de séparer le mycélium de la poudre de cellulose, mais l'erreur est peu importante, car le poids sec de ce mycélium est très faible.

Notre test a consisté à comparer la cellulolyse ainsi mesurée dans un milieu de culture additionné de doses croissantes d'extrait de tourbe H_1 (0, 5, 10, 20 ml).

La figure 32 montre la décroissance rapide de la cellulolyse : la nutrition minérale étant optimale dans le milieu de culture, force nous est d'examiner l'hypothèse d'un phénomène d'antagonisme par antibiotisme.

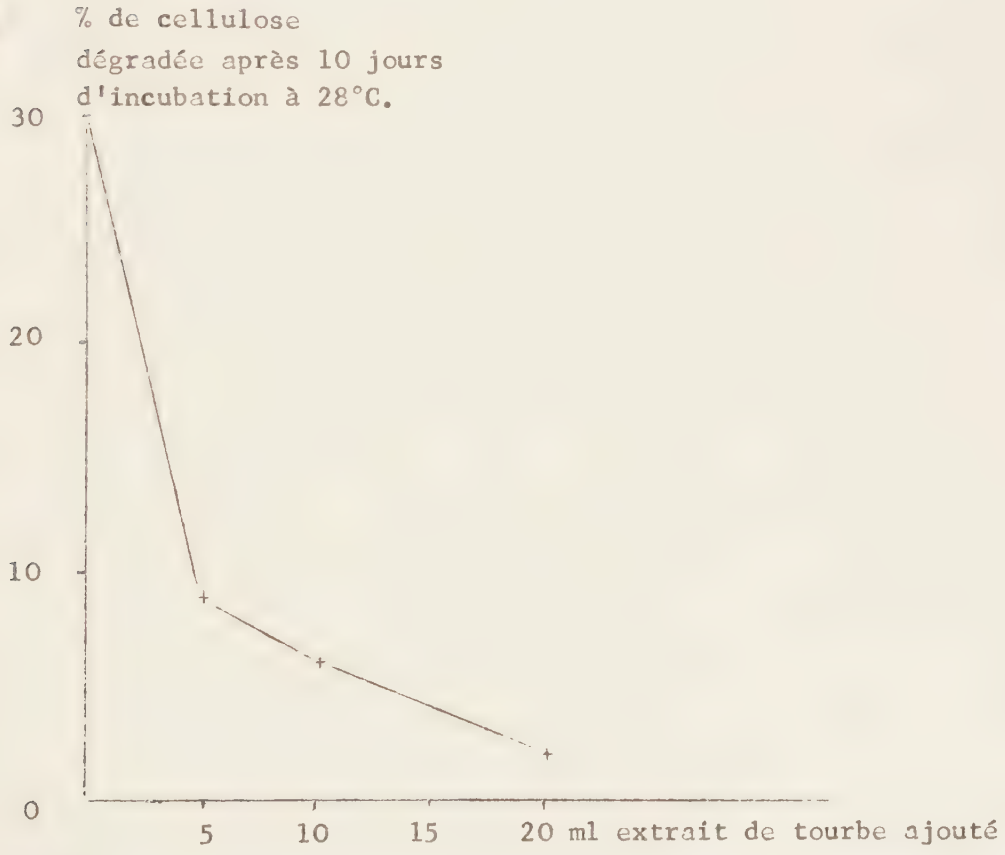


Fig. 32 a : Influence de la dégradation de cellulose (%) en fonction de la quantité d'extrait de tourbe acide du Hohneck (H_1) ajouté au milieu de Norkrans.

2 - Mise en évidence de phénomènes d'antibiotisme dans des modèles simplifiés :

Etant donné la difficulté de mettre en évidence des phénomène d'antibiotisme dans les sols eux-mêmes, nous avons imaginé des modèles simplifiés constitués par des associations de microorganismes isolés des sols organiques étudiés.

On a cultivé séparément ou en culture mixte trois champignons cellulolytiques (Aspergillus a., Aspergillus fumigatus, Trichoderma viride) et un champignon non cellulolytique (Aspergillus b)

Les activités cellulolytiques, mesurées par les méthodes décrites p. 92 des cultures pures et mixtes figurent au tableau XVII d'où les faits suivants ressortent clairement : Aspergillus fumigatus est un cellulolytique plus efficace que Trichoderma viride en culture pure ; il est partiellement inhibé par ce dernier en culture mixte. Aspergillus a. est un piètre cellulolytique quand il est seul, mais il favorise un peu la cellulolyse de Trichoderma viride quand il lui est associé. On peut penser que l'équipement enzymatique de T. viride est incomplet ou limité. Quant à Aspergillus b, non seulement il n'est pas cellulolytique, mais il inhibe la cellulolyse de Trichoderma viride ; de même Aspergillus a, inhibe partiellement la cellulolyse de Aspergillus fumigatus.

Ces différents résultats confirment les travaux de WENT & JONG (1966).

TABLEAU XVII - ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DE TRICHODERMA VIRIDE, ASPERGILLUS FUMIGATUS ET DE ASPERGILLUS a EN CULTURE PURE OU EN CULTURE MIXTE

Champignons cellulolytiques	culture pure	CULTURE MIXTE			
		+ Trichoderma viride	+ Aspergillus fumigatus	+ Aspergillus a	+ Aspergillus b
Trichoderma viride	3,40	-	3,70	3,80	0,30
Aspergillus fumigatus	5,60	3,70	-	4,02	3,83
Aspergillus a	I,45	3,80	4,02	-	0,I3

N.B. L'activité cellulotique est mesurée par la production de cellulase, exprimée en mg glucose/ml de culture/22 heures.

III. CONCLUSION

Les sols organiques pourraient être le siège de processus d'antagonisme par compétition entre la microflore cellulolytique et la microflore non cellulolytique. En effet, une expérimentation conduite sur des modèles simplifiés constitués par des cultures pures ou mixtes de T. viride montrent (1) qu'en ce qui concerne N, la microflore non cellulolytique de la tourbe acide est dotée d'une aptitude compétitive très élevée à l'encontre de T. viride. (2) en ce qui concerne P, cette aptitude compétitive est nette dans le cas des trois microflores examinées. Les résultats concernant la compétition pour P suggèrent l'intervention de processus d'antagonisme par antibiotisme ; ces processus ont effectivement pu être décelés à l'aide d'une expérimentation complémentaire.-

CHAPITRE V.- CONTRIBUTION A L'ETUDE DE DEUX MECANISMES NON BIOLOGIQUES AGGRAVANT LES CARENCES EN N ET P DANS LES SOLS ORGANIQUES

On vient de voir que, dans les sols organiques, l'activité de la microflore cellulolytique pouvait être limitée par des carences en N ou P, résultant de l'immobilisation de ces éléments par certaines espèces non cellulolytiques caractérisées par une aptitude compétitive très développée. Mais ces carences en N ou P assimilables par les micro-organismes cellulolytiques peuvent aussi être attribuées à des processus de nature non biologique tels que l'adsorption de l'ammonium ou la rétention du phosphore. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer l'importance de ces processus dans les sols organiques en les comparant à un sol non organique servant de référence (sol brun calcaire).

METHODES

1 - Mesure de l'adsorption et de la désorption de l'ion NH_4^+ (d'après SHOJI, 1962).

La méthode comporte deux phases :

(1) sur les échantillons de sol organique séchés à l'air puis tamisés, on détermine la capacité d'échange des cations (CEC) suivant la méthode classique (extraction à l'acétate d'ammonium N à pH 7,0)

(2) on prélève une quantité de sol correspondant à une CEC de 1 m.e.q. et on ajoute 0,5 m.e.q. d'ions ammonium sous forme de NH_4Cl (N/10), puis on laisse reposer à peu près trois heures pour assurer l'adsorption des ions ammonium par le sol. On effectue ensuite une extraction de l'ammonium (désorption) avec des concentrations croissantes de KCl et de $CaCl_2$: de 0, 0,125, 0,25, 0,50, 1,00 m.e.q. de Ca^{++} et K^+, dissous dans 100 ml de solution. Les échantillons sont soumis à l'agitation mécanique durant 2 heures, puis on laisse reposer durant 24 heures. Après avoir centrifugé et filtré, on prélève un ml de filtrat pour déterminer par la méthode de l'indophénol bleu la quantité d'ammonium extractible.

A l'aide de cette donnée, on calcule le taux d'adsorption de NH_4^+ :

$$\frac{NH_4^+ \text{ apporté} - NH_4^+ \text{ N extractible}}{NH_4^+ \text{ N apporté}} \times 100$$

la quantité de NH_4^+ N apporté étant par définition de 0,5 m.e.q.

2 - Mesure de la rétention de P - (d'après DROBNIKOVA, I960)

On met en contact I g de sol sec tamisé à 2 mm avec 4 ml d'une solution 0,025 M de KH_2PO_4 pendant des temps variables .0 à 24 h à 4° C.

Après ces temps de contact variables, on ajoute I6 ml de la solution de TRUOG (*), puis on agite pendant 30 mn ; par centrifugation à 3 000 t.p.m., on obtient un liquide clair dans lequel on dose P au spectrophotomètre (λ = 660) à l'aide du réactif molybdique, en présence de Chlorure stanneux.

Par taux de rétention de P, nous désignons le pourcentage suivant :

$$\frac{\text{P apporté - P extrait}}{\text{P apporté}} \times 100$$

II. RESULTATS

1 - Adsorption et désorption de NH_4^+ -

La figure 35 montre que les 4 sols étudiés se répartissent en deux groupes (I) sols à pouvoir adsorbant élevé (taux d'adsorption de 60 %) : tourbe acide H_I et sol brun calcaire, SBC. (2) sols à pouvoir adsorbant plus faible (taux d'adsorption de 30 %) : tourbe calcique G_I et mor MR.

Les figures 33 et 34 mettent en évidence les faits suivants :

(I) La désorption de NH_4^+ par Ca^{++} est plus importante que la désorption par K^+ quel que soit le type de sol.

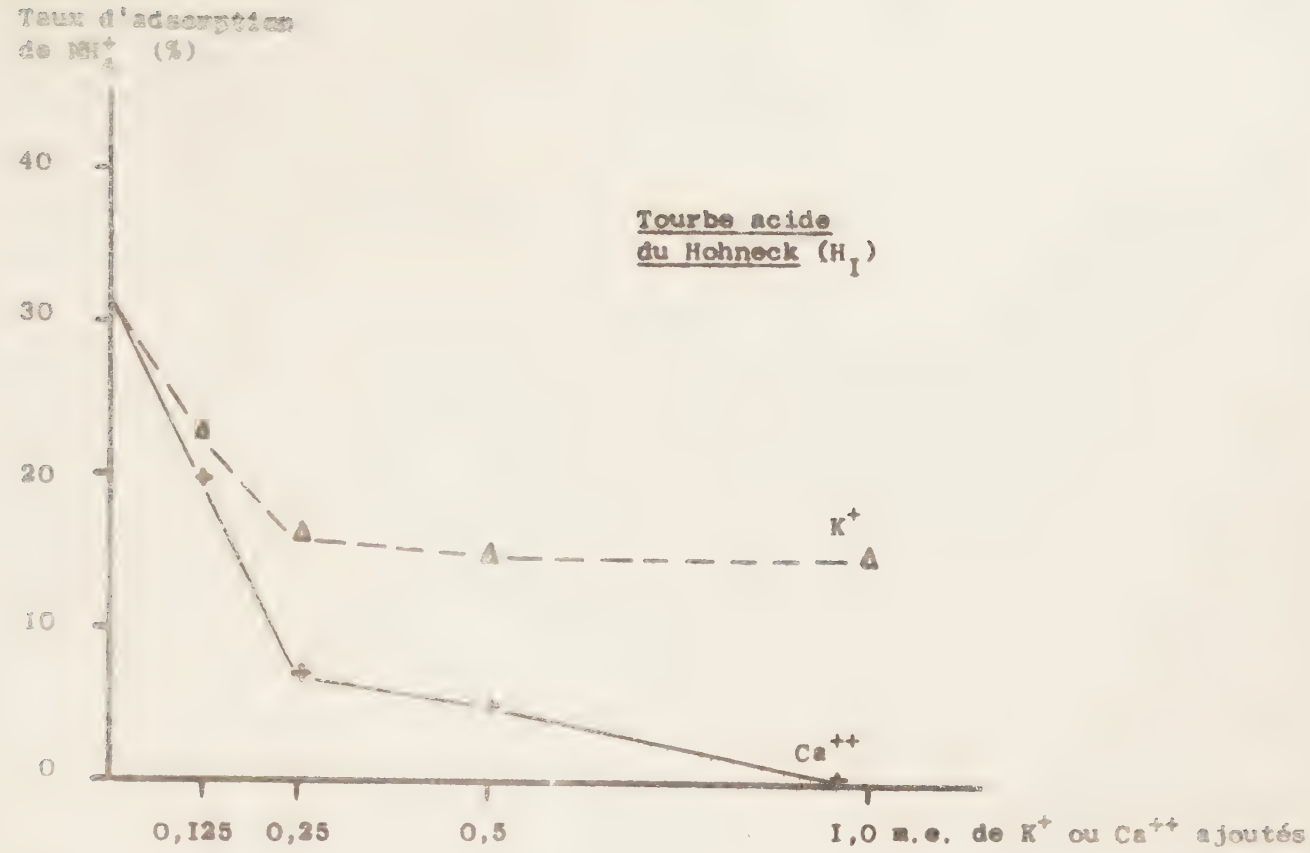
(2) Dans les trois sols organiques (H_I, G_I, MR), la désorption de NH_4^+ par Ca^{++} ou K^+ est plus importante que dans le sol non organique (SBC).

(3) La tourbe acide de Hohneck a un pouvoir d'adsorption très élevé, de l'ordre de 32 %, mais la désorption est très rapide en présence de Ca^{++} et en présence de K^+.

(*) Préparation de la solution de TRUOG :

dissoudre 0,3 % de $(NH_4)_2SO_4$ dans 0,002 N de H_2SO_4

pH : 3,0.



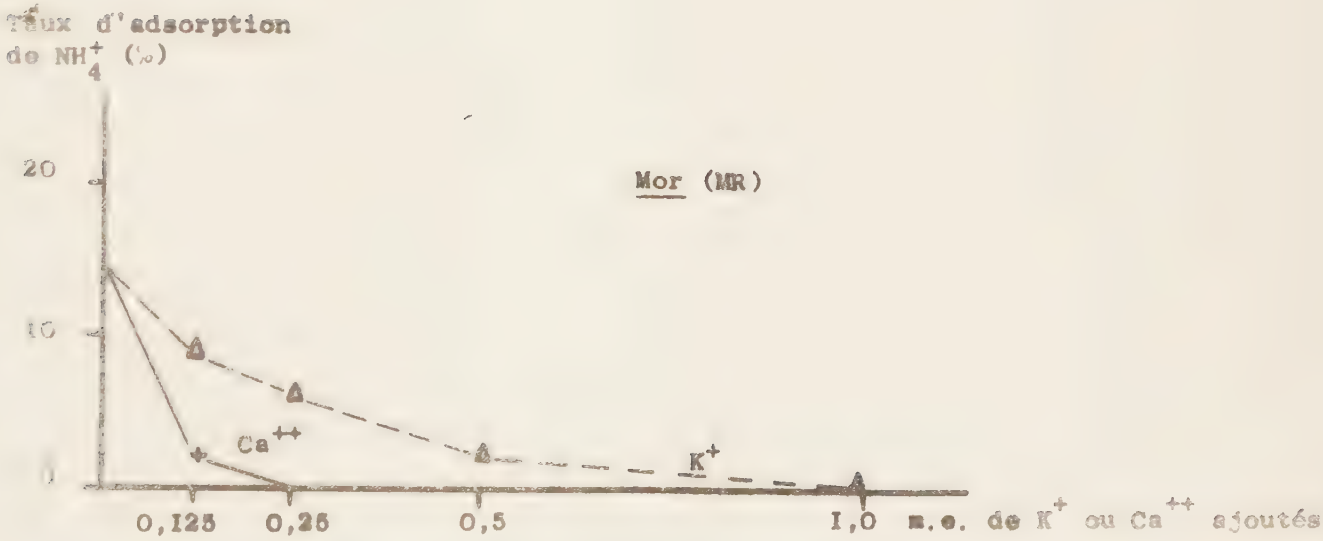
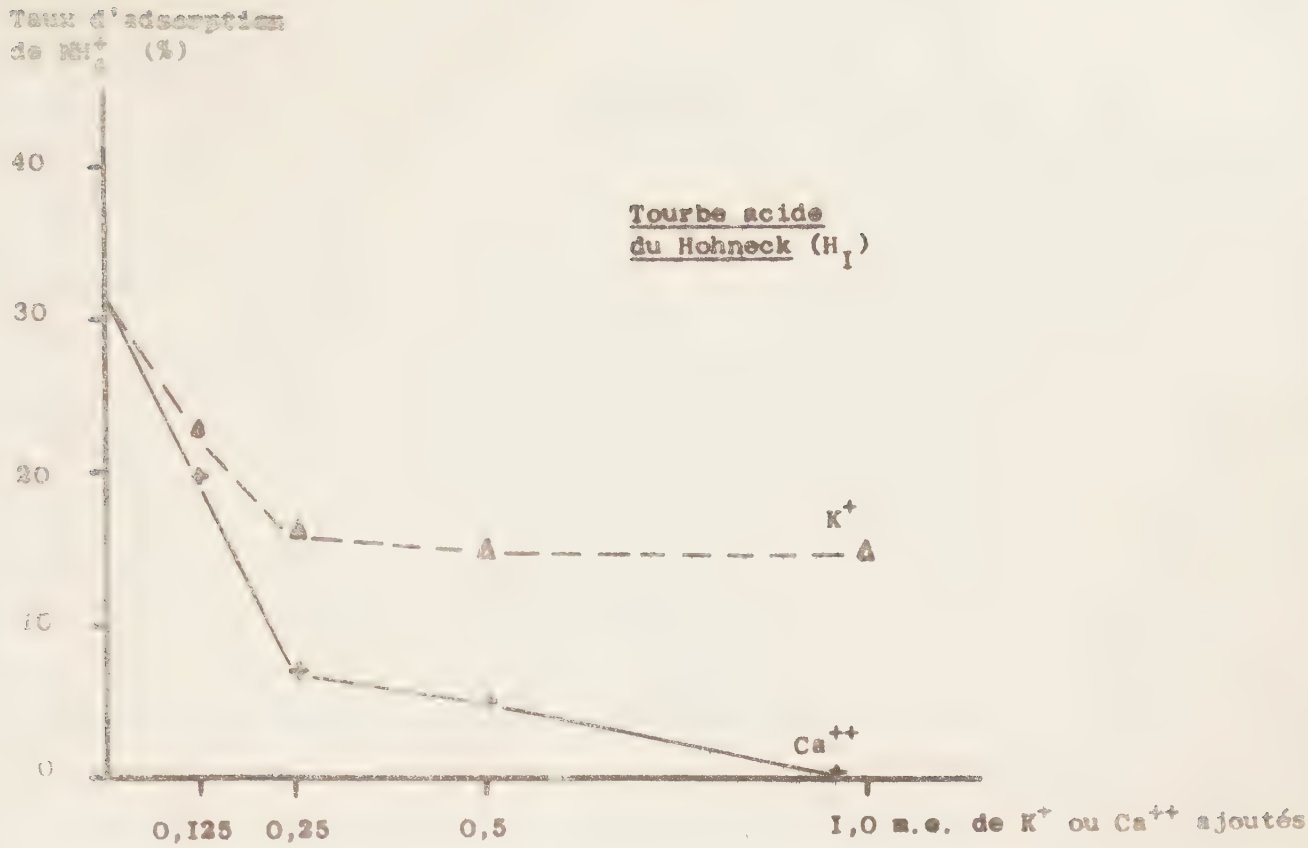


Fig. 11 - Désorption de NH_4^+ adsorbé par des doses croissantes de K^+ et Ca^{++} (Tourbe acide du Hohneck et Mor).



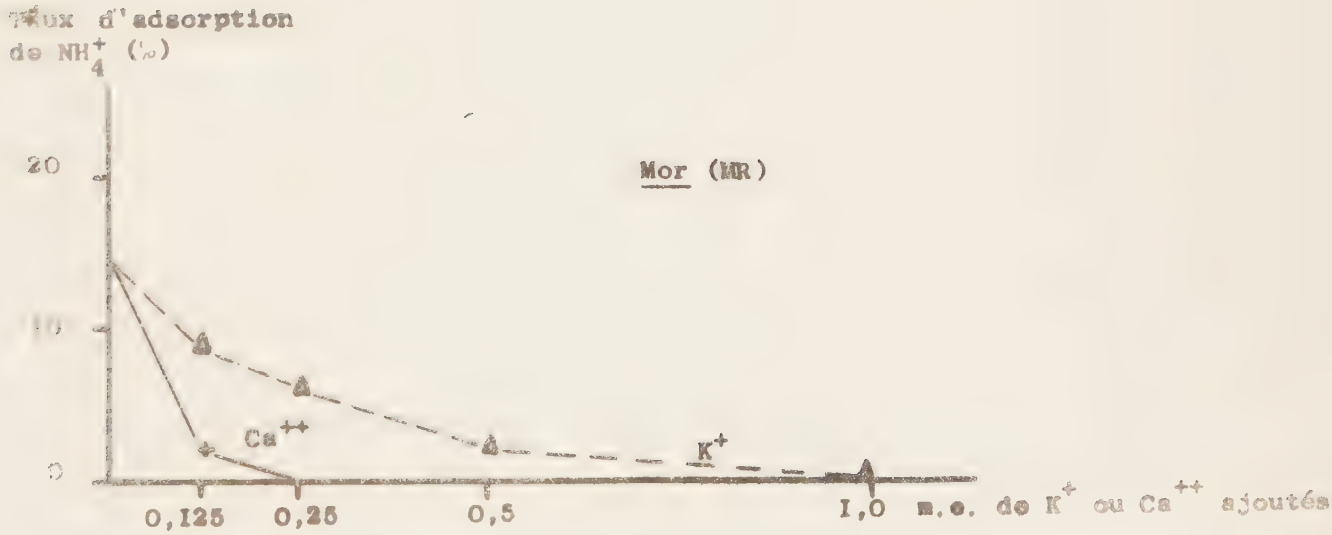


Fig. [illegible] - Désorption de NH_4^+ adsorbé par des doses croissantes de K^+ et Ca^{++} (Tourbe acide du Hohneck et Mor).

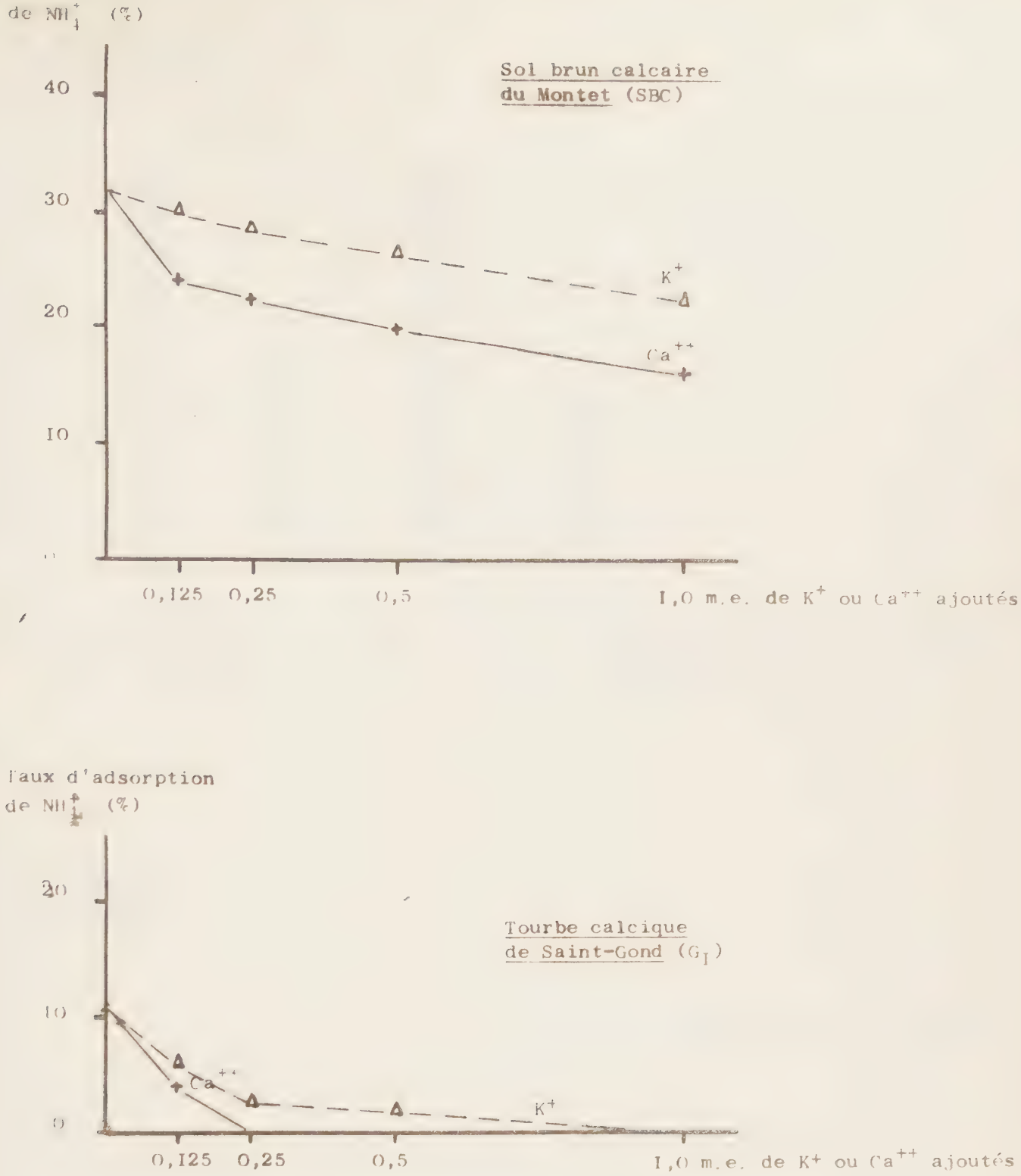


Fig. 34 - Désorption de NH_4^+ adsorbé par des doses croissantes de K^+ et Ca^{++} (sol brun calcaire et tourbe calcique)

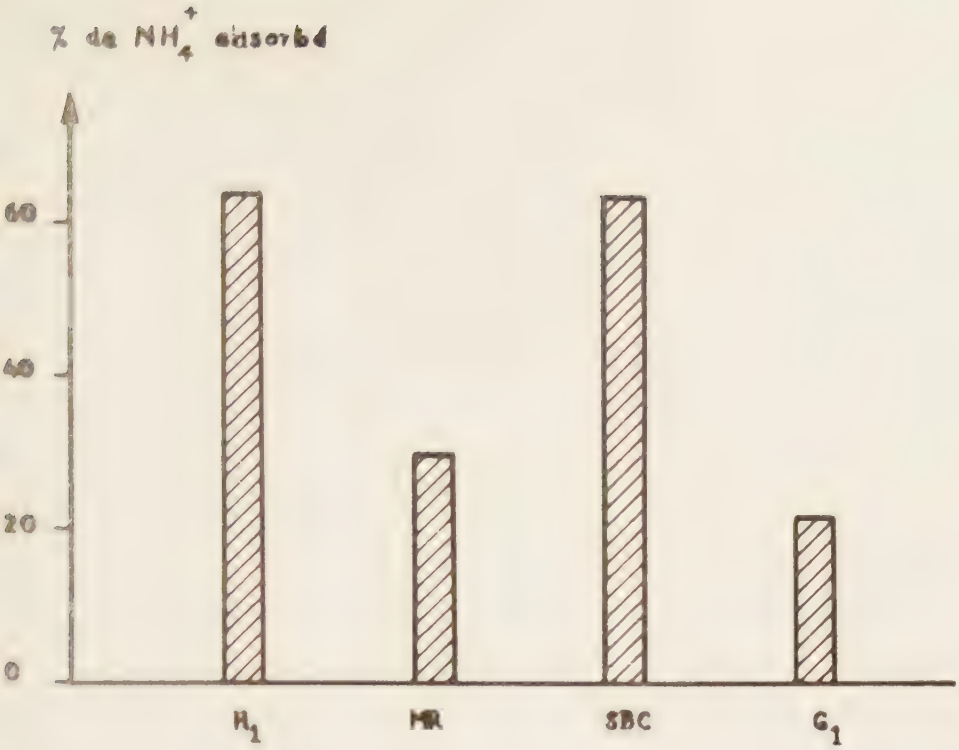


Fig. 35 - Taux d'adsorption (%) de NH_4^+ de trois sols organiques et d'un sol non organique, après apport de 0,5 m.e. de NH_4^+ à une quantité de sol représentant I m.e. de CEC ; extraction à l'eau distillée.

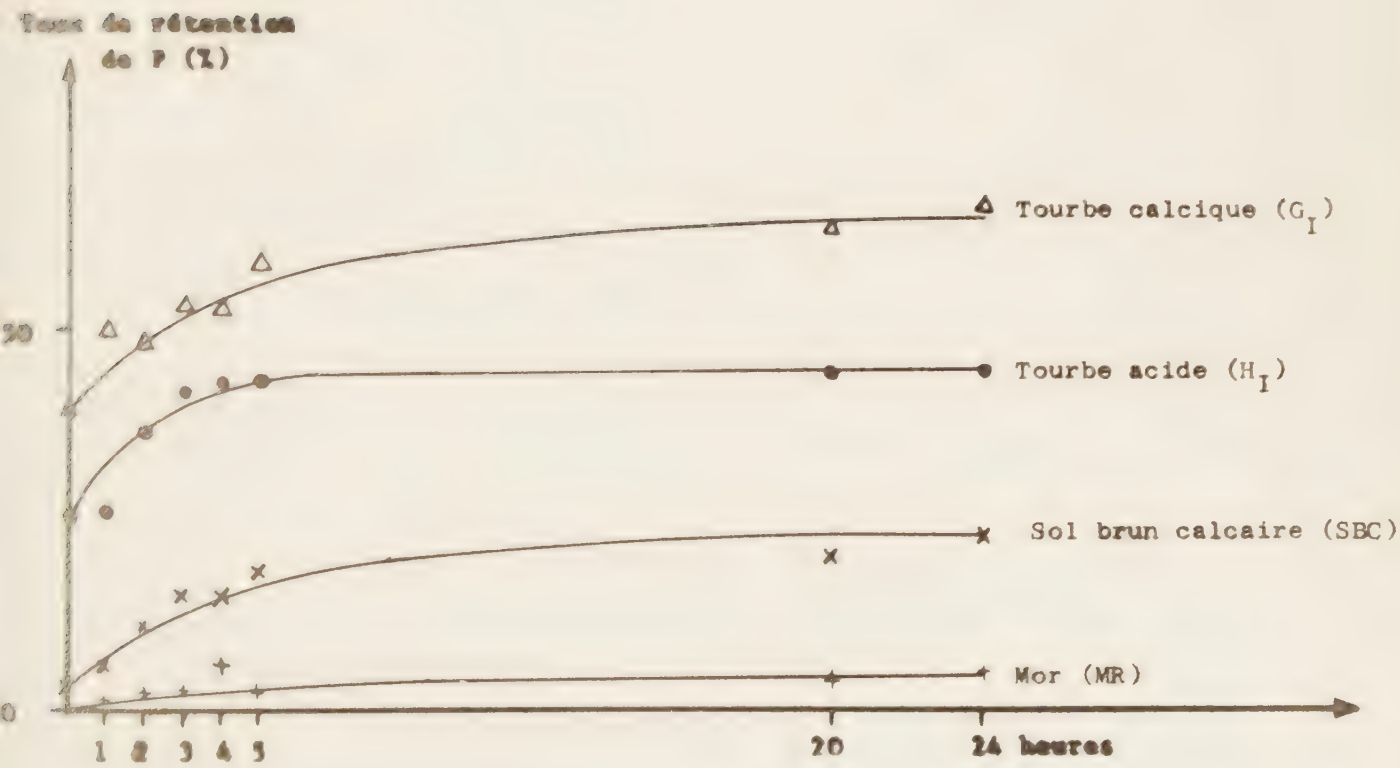


Fig. 36 - Taux de rétention (%) de P après apport de 4 ml de KH_2PO_4 (0,025 M) à I g de terre sèche ; extraction au tampon de TRUOG.

2 - Rétention de P -

Le taux de rétention de P est considérable dans le cas de la tourbe calcique puisqu'il est supérieur à 50 %. Il est encore important dans le cas de la tourbe acide (environ 40 %). Le sol non organique (SBC) est beaucoup moins actif. Quant au mor, il n'est pas le siège d'une rétention sensible.

III. CONCLUSION

A première vue (fig. 35) la tourbe acide et le sol non organique (sol brun calcaire) se comportent de la même façon puisque le taux d'adsorption de NH_4^+ par ces deux sols est identique ; mais ils diffèrent considérablement en ce qui concerne la désorption par K^+ ou Ca^{++} qui est beaucoup plus importante dans le cas de la tourbe acide (fig. 33) que dans celui du sol non organique (fig. 34). Cette désorption intense explique bien l'effet de l'apport de $CaCO_3$ sur la cellulolyse dans la tourbe acide qui a été observé antérieurement : en l'absence de $CaCO_3$, l'activité cellulolytique mesurée par le dégagement de CO_2 est de I,67 ; en présence de $CaCO_3$, elle s'élève à 9,94. Cet accroissement de l'activité cellulolytique pourrait être dû, pour une part, à la désorption d'ammonium, si l'on admet que l'ammonium en solution dans l'eau du sol est plus facilement utilisable par la microflore cellulolytique que l'ammonium adsorbé.

Les taux d'adsorption de NH_4^+ dans la tourbe calcique et dans le mor sont faibles ; c'est ce qui explique que, dans ces types de sol organique, la carence azotée joue un rôle moins important que dans le cas de la tourbe acide (tableau VII I).

La rétention du P est considérable dans le cas de la tourbe calcique (60 %), ce fait explique parfaitement l'existence de graves carences en P mises en évidence par toutes les techniques utilisées dans ce type de sol organique.

L'absence de rétention du P dans le mor (5 %) explique aussi bien qu'il n'existe pas de carence en cet élément pour les microorganismes cellulolytiques (tableau VIII).

Quant à la tourbe acide, elle occupe une position intermédiaire : le taux de rétention de P est de l'ordre de 40 % ; il correspond à une carence modérée en P (tableau VII , partie supérieure).

CONCLUSION GENERALE

Les sols organiques sont caractérisés par une cellulolyse très lente : ce fait a été vérifié in situ dans le cas d'une tourbe acide et in vitro dans le cas d'une tourbe acide, d'une tourbe calcique et d'un mor.

Pour expliquer l'inhibition de la biodégradation d'un composé organique dans un sol, on peut faire appel à deux types d'hypothèses :

- Hypothèse de la stabilité intrinsèque, cette stabilité résultant de la récalcitrance du composé considéré ;
- Hypothèse de la stabilité extrinsèque, conséquence d'un environnement défavorable.

Dans le cas de la cellulose, la première hypothèse est à rejeter: il est bien connu que ce composé organique n'appartient pas à la catégorie des molécules récalcitrantes.

Si l'on considère la deuxième hypothèse, on peut envisager l'intervention de facteurs de nature physique (phénomènes d'adsorption, d'enrobage, d'incrustation), facteurs de nature chimique (par ex. : carences, acidité, présence de composés antimicrobiens), facteurs de nature biologique (antagonisme de type compétitif ou antibiotique).

Une étude exploratoire du problème, abordé par des méthodes respirométriques et enzymatiques, nous a conduit à penser que les carences en N et P pouvaient jouer un rôle considérable dans la limitation de la cellulolyse. Nous avons été ainsi amené à rechercher les causes de ces carences qui sont apparues comme étant de nature à la fois biologique et non biologique.

I - Tourbe acide -

Les différentes expériences, à l'exception d'une expérience respirométrique, ont montré que la cellulolyse peut, dans ce type de sol, être limitée par des carences en N minéral et accessoirement des carences en P minéral soluble. Ces carences peuvent s'expliquer par l'intervention de différents processus :

(I) - Blocage de la minéralisation de l'azote organique bien mise en évidence par la pauvreté du sol en uréase ;

(2) - Antagonisme de nature compétitive pour N et P entre la microflore cellulolytique (représentée dans nos modèles expérimentaux par T. viride) et la microflore non cellulolytique ;

(3) - Antagonisme de nature antibiotique entre différentes espèces composant la microflore tellurique,

(4) - Adsorption de NH_4^+ par voie physico-chimique.
La carence en NH_4^+-N peut facilement être levée par un apport de $CaCO_3$ qui agirait non seulement en élevant le pH à un niveau compatible avec l'ammonification et avec la cellulolyse mais aussi en provoquant une désorption poussée de NH_4^+ adsorbé, rendant ainsi cet ion plus facilement assimilable par la microflore cellulolytique.

2 - Tourbe calcique -

Toutes les expériences concourrent à montrer que c'est la carence en P minéral soluble qui est responsable de la lenteur de la cellulolyse dans ce type de sol.

La carence en P peut elle même s'expliquer par l'intervention des processus suivants :

(I) - Blocage de la minéralisation du P organique mise en évidence par la pauvreté du sol en phosphatase ;

(2) - Antagonisme de nature compétitive pour P (et non pour N) entre la microflore cellulolytique (réprésentée dans nos modèles expérimentaux par T. viride) et la microflore non cellulolytique ;

(3) - Antagonisme de nature antibiotique ;

(4) - Rétention très importante du P minéral, vraisemblablement sous forme de phosphate de calcium insoluble, ce dernier processus semblant jouer un rôle primordial dans la carence en P minéral soluble assimilable par les microorganismes cellulolytiques.

3 - Mor -

Ce sol organique présente incontestablement des ressemblances avec la tourbe acide : son équipement enzymatique, en particulier est comparable (fig. 24,25,26). Mais, dans ce sol, la limitation de la cellulolyse ne peut être attribuée à des carences en N ou P ; l'apport de $CaCO_3$ n'est pas très efficace pour lever l'inhibition de la cellulolyse.

Ces carences modérées en N ou P pourraient s'expliquer par les processus de nature biologique invoqués dans le cas des deux sols précédents ; elle ne peut l'être par les processus de nature non biologique, le mor ne présentant qu'un pouvoir adsorbant limité pour NH_4^+ et un pouvoir de rétention pour P négligeable.

On est donc amené, dans ce type de sol organique, à emettre (I) soit l'hypothèse déjà avancée par ailleurs (BECK et al, 1969) de l'intervention de composés antimicrobiens d'origine végétale ou microbienne, (2) soit l'hypothèse de l'intervention de carences autres que les carences en N ou P , (3) soit l'hypothèse de l'intervention de facteurs physiques défavorables tels que l'anaérobiose.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALEXANDER (M.), 1965 .- Biodegradation : problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. Adv. Appl. Microb. 7, 35-80.

2 - BARJAC (H.), 1955 .- Essai d'interprétation bactérioécologique de sols tourbeux acides. Thèse.

3 - BECK (G.) DOMMERGUES (Y.) VAN DEN DRIESSCHE (R.), 1969 .- L'effet litière II. Etude expérimentale du pouvoir inhibiteur des composés hydrosolubles des feuilles et des litières forestières vis-à-vis de la microflore tellurique. Oecol. Plant., 4, 237-266.

4 - BENE (R.) GIRARD (Th.) BALDO (S.), 1968 .- Aspects de la cellulolyse dans quelques types de "Sols biologiquement pauvres". Ann. Inst. Pasteur, 115, 538-541.

5 - BOLLETER (W.T.) BUSHMAN (C.J.) TIDWELL (P.W.), 1961 ?- Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. Anal. Chem. 33(4),592-594.

6 - BROADBENT (F.E.) NAKASHIMA (T.), 1967 .- Reversion of fertilizer nitrogen in soils. Soil Sc. Soc. Am. Proc. 31 (5), 648-652.

7 - CHARPENTIER (M.), 1965 .- Thèse Doct. Pharm. Paris, Ann. Inst. Pasteur, 109, 771. Etude de l'activité cellulolytique de Sporocytophaga myxococcoides.

8 - DANIEL (L.J.) NEAL (A.L.), 1967 .- Laboratory experiments in Biochemistry, New-York.

9 - DOMMERGUES (Y.), 1960 .- La notion de coefficient de minéralisation du carbone dans les sols. Agron. trop. 15, 54-60.

10 - DOMMERGUES (Y.) et MANGENOT (F.), 1970 .- Ecologie microbienne du Sol, Masson & Cie. Paris.

11 - DROBNIKOVA (V.), 1961 .- Factors influencing the determination of phosphatases in soil. Folia Microbiologica, 6, 260-267.

12 - DUCHAUFOUR (Ph.), 1965 .- Précis de Pédologie (2ème édition), Masson & Cie, Paris.

13 - DUNNETT (C.W.) , 1955 .- A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. H. Amer. Stat. Assoc., 50, 1096-1122.

14 - FLORENZANO (G.) MATERASSI (R.) et FAVILLI (F.), 1968 .- Activité cellulolytique dans les sols cultivés et influence des engrais. Ann. Inst. Pasteur, 115, 569-574.

15 - GARDINER (J.J.), 1966 .- The nutrient status of irish peat bogs. Ir. For. 23, 5-13.

16 - HARRIS (P.J.), 1966 .- An improved simple macrorespirometer. J. Appl. Bacteriol., 29 (2), 399-400.

17 - HOFFMANN (G.) TEICHER (K.), 1961 .- Einkolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Boden Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde, 95, 55-63.

18 - HOFFMANN (G.) DEDEKEN (M.), 1965 .- Eine Methode zur Kolorimetrischen Bestimmung der β-glucosidase Aktivität in Böden Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkunde, 108 (3), 193-199.

19 - HOFFMANN (G.), 1967 .- Photometric determination of phosphatase activity in soil. Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde, 118, 161-172.

20 - HUGGETT (A. St. G.) NIXON (D.A.), 1957 .- Enzymic determination of blood glucose, 66, 12 p.

21 - KIFFER (E.) MANGENOT (F.), 1968 .- Activité cellulolytique de quelques sols forestiers. Ann. Inst. Pasteur, 115, 582-595.

22 - KONG (K.T.) DOMMERGUES (Y.), 1970 a. .- Limitation de la cellulolyse dans les sols organiques. I. Etude respirométrique. Rev. Ecol. Biol. Sol (sous presse).

23 - KONG (K.T.) DOMMERGUES (Y.), 1970 b. .- Limitation de la cellulolyse dans les sols organiques. II. Etude des enzymes du sol. Rev. Ecol. Biol. Sol (sous presse).

24 - KÜSTER (E.), 1963 .- Studies on irish peat bogs and their microbiology. Microbiol. Espan. 16, 203-208.

25 - MILLER (G.L.), 1960 .- Micro column chromatographic method for analyse of olisaccharides. Anal. Bioch. 2, 133-140.

26 - MILLER (R.H.) SCHMIDT (E.L.), 1963 .- Manometric study of nitrogen utilization during early stages of cellulose decomposition in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27(4), 374-377.

27 - NORKRANS (B.), 1963 .- Influence of some cultural conditions on fungal cellulase production. Physiolcgia Pl. 16, 11-19.

28 - REESE (E.T.) SIU (R.G.H.) LEVINSON (H.S.), 1950 .- Biological degradation of soluble cellulose. J. Bact. 59, 485.

29 - REESE (E.T.) LEVINSON (H.S.), 1952 .- A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plantarum, 5, 345.

30 - REESE (E.T.), 1968 .- Microbial transformation of soil polysaccharides, Pontificiae Academiae Scientarum Scripta varia, 32, 535-581.

31 - SHOJI (S.) MATSUMI (S.), 1962 .- Chemical characteristics of peat soils. v. Behaviour of Cations. 78, 62-73.

32 - SUMNER (J.B.) SOMERS (G.F), 1944 .- Laboratory experiments in biological chemistry. Acad. Press. New-York, p. 38.

33 - WENT (J.) JONG (F.), 1966 .- Decomposition of cellulose in soils. Antonie van Leeuwenhoek, 32, 39-56.

16 - HARRIS (P.J.), 1966 .- An improved simple macrorespirometer. J. Appl. Bacteriol., 29 (2), 399-400.

17 - HOFFMANN (G.) TEICHER (K.), 1961 .- Einkolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Boden Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde, 95, 55-63.

18 - HOFFMANN (G.) DEDEKEN (M.), 1965 .- Eine Methode zur Kolorimetrischen Bestimmung der β-glucosidase Aktivität in Böden Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkunde, 108 (3), 193-199.

19 - HOFFMANN (G.), 1967 .- Photometric determination of phosphatase activity in soil. Z. Pflanzenernähr. Düngung Bodenkde, 118, 161-172.

20 - HUGGETT (A. St. G.) NIXON (D.A.), 1957 .- Enzymic determination of blood glucose, 66, 12 p.

21 - KIFFER (E.) MANGENOT (F.), 1968 .- Activité cellulolytique de quelques sols forestiers. Ann. Inst. Pasteur, 115, 582-595.

22 - KONG (K.T.) DOMMERGUES (Y.), 1970 a. .- Limitation de la cellulolyse dans les sols organiques. I. Etude respirométrique. Rev. Ecol. Biol. Sol (sous presse).

23 - KONG (K.T.) DOMMERGUES (Y.), 1970 b. .- Limitation de la cellulolyse dans les sols organiques. II. Etude des enzymes du sol. Rev. Ecol. Biol. Sol (sous presse).

24 - KÜSTER (E.), 1963 .- Studies on irish peat bogs and their microbiology. Microbiol. Espan. 16, 203-208.

25 - MILLER (G.L.), 1960 .- Micro column chromatographic method for analyse of olisaccharides. Anal. Bioch. 2, 133-140.

26 - MILLER (R.H.) SCHMIDT (E.L.), 1963 .- Manometric study of nitrogen utilization during early stages of cellulose decomposition in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27(4), 374-377.

27 - NORKRANS (B.), 1963 .- Influence of some cultural conditions on fungal cellulase production. Physiolcgia Pl. 16, 11-19.

28 - REESE (E.T.) SIU (R.G.H.) LEVINSON (H.S.), 1950 .- Biological degradation of soluble cellulose. J. Bact. 59, 485.

29 - REESE (E.T.) LEVINSON (H.S.), 1952 .- A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. Physiol. Plantarum, 5, 345.

30 - REESE (E.T.), 1968 .- Microbial transformation of soil polysaccharides, Pontificiae Academiae Scientarum Scripta varia, 32, 535-581.

31 - SHOJI (S.) MATSUMI (S.), 1962 .- Chemical characteristics of peat soils. v. Behaviour of Cations. 78, 62-73.

32 - SUMNER (J.B.) SOMERS (G.F), 1944 .- Laboratory experiments in biological chemistry. Acad. Press. New-York, p. 38.

33 - WENT (J.) JONG (F.), 1966 .- Decomposition of cellulose in soils. Antonie van Leeuwenhoek, 32, 39-56.